Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

Microbiologia:

Geração de conhecimento e caráter multidisciplinar

Ano 2022

Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

Microbiologia:

Geração de conhecimento e caráter multidisciplinar

Ano 2022

CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS
E DA SAÚDE

Atena
Editora
Ano 2022

Microbiologia: geração de conhecimento e caráter multidisciplinar

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Yaiddy Paola Martinez
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Alana Maria Cerqueira de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M626 Microbiologia: geração de conhecimento e caráter multidisciplinar / Organizadora Alana Maria Cerqueira de Oliveira. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-0644-0
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.440222909

1. Microbiologia. 2. Genética. 3. Biologia molecular. 4. Biotecnologia. 5. Bacteriologia. 6. Virologia. 7. Patologia. I. Oliveira, Alana Maria Cerqueira de (Organizadora). II. Título.
CDD 579

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

A Obra “Microbiologia: Geração de conhecimento e caráter multidisciplinar” publicada no formato e-book, traz ao leitor cinco artigos de relevada importância na área de Microbiologia. O Foco principal desta obra é atualização sobre o tipo de pesquisa que se vem fazendo atualmente na área, discursão e divulgação cientifica de pesquisas nacionais, englobando as diferentes áreas afins.

Atualmente é evidente o avanço científico nesta área, o que aumenta a importância e a necessidade de atualização e consolidação de conceitos, técnicas, procedimentos e temas.

As pesquisas científicas produzidas em diversas regiões do país, estão divulgadas na forma de artigos originais e de revisões abrangendo os diferentes campos dentro da área de Microbiologia e suas conexões. Portanto, englobando a: Microbiologia, Genética, Biologia molecular, Biotecnologia, Bacteriologia, Virologia e Patologia. Produzindo assim uma obra multidisciplinar e transversal que vai desde a pesquisa básica a aplicação prática.

A obra foi elaborada primordialmente com foco nos profissionais, pesquisadores e estudantes da área de Microbiologia e suas interfaces ou áreas afins. Entretanto, é uma leitura interessante para todos aqueles que de alguma forma se interessam pela área.

Cada capítulo foi elaborado com o propósito de transmitir a informação científica de maneira clara e efetiva, em português ou inglês, linguagem acessível, concisa e didática, atraindo a atenção do leitor, independente se seu interesse é acadêmico ou profissional.

Os capítulos desta obra explanam sobre: *Shigella sonnei,* suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum,* triagem sorológico-molecular para o vírus da hepatite C e análise de polpa de goiaba.

O livro “Microbiologia: Geração de conhecimento e caráter multidisciplinar “, traz publicações atuais e a Atena Editora traz uma plataforma que oferece uma estrutura adequada, propicia e confiável para a divulgação científica de diversas áreas de pesquisa.

Uma ótima leitura a todos(as)!

Alana Maria Cerqueira de Oliveira

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

PLASMÍDIOS CONJUGATIVOS ISOLADOS DO ENTEROPATÓGENO *Shigella sonnei* CODIFICAM SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Data de aceite: 28/09/2022

Jaqueline Silvana Moreira
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
http://lattes.cnpq.br/6047605045111426

Jamil Silvano de Oliveira
Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Brasil
http://lattes.cnpq.br/9091111327326713

Desielle de Matos Clementino
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
http://lattes.cnpq.br/4303281638405890

Paula Prazeres Magalhães
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
http://lattes.cnpq.br/2184773662680617

Luiz de Macêdo Farias
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
http://lattes.cnpq.br/3041207015099007

RESUMO*:* *Shigella*, um enteropatógeno invasivo, é responsável pela disenteria bacilar ou shigelose, doença diarreica grave que acomete, principalmente, crianças de países subdesenvolvidos. A bactéria expressa diversos fatores de virulência, inclusive, substâncias antagonistas e resistência aos antimicrobianos. Estas substâncias são codificadas, frequentemente, por genes plasmidiais, que podem ser transferidos por processos de recombinação, como conjugação bacteriana. O presente estudo foi realizado com o objetivo de determinar se a resistência aos antimicrobianos e a(s) substância(s) antagonista(s) sintetizadas por *Shigella sonnei* SS9 são codificadas por genes plasmidiais. Como reveladora da expressão antagonista e receptora dos plasmídios, foram empregadas as amostras *S. sonnei* SS12 e *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente. Para o ensaio de conjugação SS9 e *E. coli* foram avaliadas quanto aos seus perfis de suscetibilidade a antimicrobianos. Após seleção do antimicrobiano, SS9 e *E. coli* foram cultivadas separadamente, as culturas ajustadas em escala *McFarland 0,5 e diluídas 1:50*. Uma alíquota de cada amostra foi adicionada a um mesmo tubo e o material foi incubado. Em intervalos de tempos pré-determinados, alíquotas foram cultivadas em MacConkey Agar com e sem antimicrobiano. Colônias lac^{+} foram avaliadas quanto à expressão de antagonismo. Colônias positivas foram submetidas a extração plasmidial e análise por eletroforese. Após o cultivo de uma amostra transconjugante, o material foi centrifugado e o sobrenadante analisado pelo ensaio antagonista. Análise da curva de crescimento do

transconjugante com síntese de substância(s) bioativa(s) também foi realizada. Os resultados demostram que a amostra transconjugante passou a albergar plasmídios conjugativos com presença de genes que codificam resistência aos antimicrobianos ampicilina e trimetropima além da produção de substância(s) antagonista(s). Comprovando a presença de fatores de virulência, que podem ser transferidos por conjugação, a partir do enteropatógeno *S. sonnei,* que foi reconhecido pela Organização Mundial de Saúde como um dos doze patógenos que necessitam, com urgência, do desenvolvimento de novos fármacos.
PALAVRAS-CHAVE: *Shigella sonnei*, substância antagonista, enteropatógenos, conjugação bacteriana, resistência antimicrobiana.

CONJUGATIVE PLASMIDS ISOLATED FROM THE ENTEROPATOGEN *Shigella sonnei* CODE ANTAGONIST SUBSTANCE(S) AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE

ABSTRACT: *Shigella*, an invasive enteropathogen, is responsible for bacillary dysentery or shigellosis, a severe diarrheal disease that mainly affects children in underdeveloped countries. The bacterium expresses several virulence factors, including antagonistic substances and antimicrobial resistance. These substances are often encoded by plasmid genes, which can be transferred by recombination processes, such as bacterial conjugation. The present study was carried out to determine whether antimicrobial resistance and antagonist substance(s) synthesized by *S. sonnei* SS9 are encoded by plasmid genes. As a developer of plasmid antagonist and receptor expression, samples *S. sonnei* SS12 and *E. coli* ATCC 25922, respectively, were used. For the SS9 and *E. coli* conjugation assay they were evaluated for their antimicrobial susceptibility profiles. After antimicrobial selection, SS9 and *E. coli* were grown, separately, cultures adjusted to McFarland 0.5 scale and diluted 1:50. An aliquot of each sample was added to the same tube and the material was incubated. At predetermined time intervals, aliquots were cultured on MacConkey Agar with and without antimicrobial. Lac+ colonies were evaluated for antagonism expression. Positive colonies were subjected to plasmid extraction and electrophoresis analysis. After culturing a transconjugant sample, the material was centrifuged and the supernatant analyzed by the antagonist assay. Growth curve analysis of the transconjugant with synthesis of bioactive substance(s) was also performed. The results show that the transconjugant sample started to harbor conjugative plasmids with the presence of genes that encode resistance to the antimicrobials ampicillin and trimethopine, in addition to the production of antagonist substance(s). Proving the presence of virulence factors, which can be transferred by conjugation, from the enteropathogen *S. sonnei*, which was recognized by the World Health Organization as one of the twelve pathogens that, urgently, need the development of new drugs.
KEYWORDS: *Shigella sonnei*, antagonist substance, enteropathogens, bacterial conjugation, antimicrobial resistence.

1 I INTRODUÇÃO

Pertencente ao filo Proteobacteria, classe Gamaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família *Enterobacteriaceae,* o gênero *Shigella* é constituído por bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, não capsulados e incapazes

de fermentar a lactose [11; 16; 20; 22; 28]. As quatro espécies do gênero, podem ser distinguidas com base em provas bioquímicas e sorológicas em *S. sonnei* (1 sorotipo), *S. flexneri* (18 sorotipos), *S. dysenteriae* (15 sorotipos) e *S. boydii* (20 sorotipos) [10].

Shigella spp. *é* o agente etiológico da shigelose, que têm os seres humanos como único reservatório conhecido [29]. A bactéria apresenta padrão de disseminação mundial, com cerca de 188 milhões de indivíduos infectados e aproximadamente 164 mil óbitos/ano, a maioria, crianças [9]. A transmissão ocorre, principalmente, pela rota fecal-oral, via ingestão de água e alimentos contaminados, mas também é observada a transmissão via f*ômites*, moscas e contato sexual [29]. Sendo necessárias de 10 a 100 células bacterianas para o desenvolvimento da doença [7]. Que manifesta-se pela ocorrência de febre superior a 38 °C, cólicas abdominais e eliminação de fezes mucossanguinolentas, com presença do patógeno viável por algumas semanas [29]. Formas mais graves de apresentação incluem vômitos, anorexia e formação de abcessos e ulcerações na mucosa. Em alguns casos, são relatados mais de 20 episódios evacuatórios por dia [1; 6; 13; 15; 16; 20; 26].

Pacientes que apresentam formas moderadas de shigelose podem ser tratados com hidratação por via oral e alimentação balanceada. Entretanto, recomenda-se antibioticoterapia, com o intuito de se reduzir a duração e a gravidade do quadro, além de limitar a disseminação da bactéria [12; 17; 21].

Resistência a fármacos antimicrobianos, até mesmo perfil *multi-drug resistant* (MDR) e *extensively drug-resistant* (XDR), vem sendo descritos para *Shigella*. spp. Inclusive, de modo preocupante, no último ano, a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi notificada da ocorrência de elevados casos de Shigelose causada por *S. sonnei* (XDR) em diversos países como Reino Unido e Grã-Bretanha. O que desperta preocupação, devido à baixa disponibilidade de fármacos ativos capazes de controlar a disseminação e a gravidade da doença [29]. Para tanto, a OMS incluiu *Shigella* spp. na lista dos doze patógenos que requerem, com urgência, a proposição de novas medidas de tratamento [6].

Substâncias antagonistas, dentre essas peptídios e proteínas antimicrobianas, podem ser codificadas por genes plasmidiais ou cromossômicos. Elas são consideradas componentes de virulência produzidas por bactérias por auxiliar na conquista de um habitat e na competição por nutrientes, uma vez que atuam contra outros microrganismos. No entanto, devido à bioatividade molecular dessas substâncias também despertam grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos podendo contribuir no desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos, que podem, no futuro, serem uma alternativa no tratamento de algumas doenças, inclusive, Shigelose [23; 25].

Com base no crescente perfil de resistência a múltiplos fármacos, na capacidade de *S. sonnei* produzir substâncias com ação antagonista a outro isolado da mesma espécie e a possibilidade desses genes de resistência e produção de substâncias antagonistas serem codificados por plasmídios conjugativos. O objetivo desse trabalho foi investigar a presença de plasmídios conjugativos presente em um isolado de *S. sonnei,* capazes de contribuírem

com a virulência do patógeno, por codificarem a produção de substância(s) antagonista(s) e perfil de resistência aos antimicrobianos.

2 I MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras bacterianas

Duas amostras de *S. sonnei*, (SS9 e SS12) foram utilizadas no estudo como produtora(s) de substância(s) antagonista(s) e reveladora do antagonismo, respectivamente. Elas foram obtidas de amostras fecais de crianças com shigelose atendidas no Hospital Infantil João Paulo II, Belo Horizonte, Brasil [24]. Para a escolha da amostra receptora empregada no ensaio de conjugação, foi realizado o teste de difusão em sobrecamada, utilizando um painel de três amostras, *E. coli* K12 Row, *E. coli* ATCC 25922 e *S. flexneri* ATCC 12022. Todas as amostras fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios e vêm sendo mantidas em caldo Brucella (BBL, Sparks, MD, EUA) adicionado com 10% de glicerol (v/v) a -80°C.

Teste de difusão em sobrecamada

Antes do uso, todas as cepas foram cultivadas por três dias consecutivos em Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, Sparks, MD, EUA) a 37 °C, por 24 h, em aerobiose. As amostras foram inoculadas, separadamente, em Tryptic Soy Broth (TSB; Difco), e incubadas nas mesmas condições. A concentração de cada cultura foi ajustada para leitura de 0.08 a 0.10 usando ʎ de 625 nm [4]. Alíquotas das amostras foram analisadas como produtoras e reveladoras da ação antagonista (QUA. 1). Para o ensaio, 10 μL da cultura da possível amostra produtora foi depositada sobre a superfície de TSA e a placa incubada na mesma condição. As células viáveis foram eliminadas pela exposição de vapor ao clorofórmio por 30 min seguido de placa entre aberta, em ambiente estéril, para eliminação do vapor de clorofórmio. A placa foi recoberta com 3.5 mL de TSA semissólido (TSB + 0.7% ágar) contendo 10 μL da possível amostra reveladora e incubada como descrito acima. A atividade antagonista foi observada pela presença ou ausência de halo de inibição em torno da amostra produtora [3, 8; 18; 19].

Produtora de substância antagonista	Reveladora da expressão de antagonismo				
	S. sonnei SS9 [b]	*S. sonnei* SS12	*S. flexneri* ATCC 12022	*E. coli* K12 Row	*E. coli* ATCC 25922
E. coli K12 Row[a]	T [c]	T	NT	NT	NT
E. coli ATCC 25922	T	T	NT	NT	NT
S. flexneri ATCC 12022	T	T	NT	NT	NT
S. sonnei SS9	NT[d]	CP [e]	T	T	T

[a], amostras avaliadas como produtoras de substância antagonista; [b], amostras testadas como reveladoras da expressão de antagonismo; [c], teste realizado; [d],não testado; [e], controle positivo.

Quadro 1: Avaliação da atividade antagonista e suscetibilidade celular frente à substância antagonista para seleção de uma amostra receptora para teste de conjugação.

Antibiograma

As amostras *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC 25922 foram empregadas no ensaio de antibiograma pelo método de disco difusão. *E. coli* ATCC 25922 é recomendada, pelo CLSI 2018, como amostra controle para os ensaios de antibiograma que envolvam membros da família *Enterobacteriaceae*. No presente estudo, ela também foi empregada como candidata à receptora no processo de conjugação. Para o ensaio, foi empregado um painel de 19 fármacos antimicrobianos, das seguintes classes: penicilinas, cefalosporinas de primeira a quarta gerações, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, monobactâmicos, anfenicóis e sulfonamidas. Os discos foram selecionados com base na resistência aos antimicrobianos conferida por plasmídios.

Para o teste, foram dispensados 50 mL de *Mueller Hinton Agar* (Difco)/placa 150x30 mm e, após a solidificação do meio, as amostras *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC 25922, ambas cultivadas em *Mueller-Hinton Broth* (Difco), ajustadas em espectrofotômetro com absorbância de 625 nm, leitura de 0,08 a 0,10, foram semeadas com o auxílio de *swab*. Os discos antimicrobianos foram depositados na superfície do meio e o material foi incubado a 37 °C, por 16 h, em aerobiose. A leitura foi realizada pela observação macroscópica da presença de halo de inibição e medição, com paquímetro, de cada halo [4; 5].

Conjugação

SS9 foi empregada no ensaio para verificar a capacidade de transferência, por conjugação, de plasmídios que albergam genes codificadores de substância(s) antagonista(s) e de resistência aos antimicrobianos. *E. coli* ATCC 25922 foi avaliada como receptora de tais plasmídios.

As amostras em estudos foram inoculadas em 2 mL de caldo Penassay (Difco) e incubadas por 24 h, sem agitação, em atmosfera de aerobiose, a 37 °C. As culturas foram

ajustadas em espectrofotômetro com absorbância de 625 nm, para leitura de 0,08 a 0,10, e diluídas 1:50 v/v, com volume final de 3 mL, no mesmo caldo. Os tubos foram incubados nas mesmas condições acima, por 3 h, sob agitação a 300 rpm. As culturas foram diluídas, no mesmo caldo, na proporção 1:10 v/v. Um volume de 1 mL das culturas das amostras produtora e receptora foram, então, misturadas em tubo de ensaio estéril. As amostras foram incubadas em atmosfera de aerobiose, a 37 °C. Nos intervalos de tempo 0, 15 e 30 min, 1, 3, 5 e 24 h, alíquotas de 100 μL foram semeadas em MacConkey Agar (Difco) acrescido de ampicilina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) 32 µg/mL. As mesmas amostras foram diluídas 1:10 v/v em Caldo Penassay e 100 μL foram semeados em meio sem antibiótico. Como controle, 100 μL das amostras produtora e receptora foram inoculadas no mesmo meio com e sem ampicilina. As placas foram incubadas em atmosfera de aerobiose, a 37 °C, por 24 h. A leitura foi realizada pela contagem das colônias lactose positivas (Lac^+) [27].

Confirmação dos resultados de conjugação e expressão antagonista

Para assegurar a ausência de colônias de *Shigella* nas amostras recuperadas no ensaio de conjugação, as colônias lac^+ foram estriadas em MacConkey Agar e incubadas em aerobiose, a 37 °C, por 24 h. As colônias de *E. coli* obtidas foram cultivadas em TSA, nas mesmas condições descritas anteriormente. Clones das amostras em estudo foram obtidos usando a técnica de plaqueamento de réplicas [14]. O ensaio de difusão em sobrecamada foi realizado com as amostras de *E. coli* transconjugantes da placa réplica.

Extração plasmidial e eletroforese

Para confirmar o sucesso da conjugação, foi realizado o ensaio de extração plasmidial das amostras *S. sonnei* SS9, *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* transconjugante, utilizando-se o *kit 96 Well Plasmid Kit* (Geneaid, New Taipei City, Taiwan). Os produtos obtidos e o padrão de massa molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix # SM0331/2/3 (Fermentas, Life Sciences, Alemanha) foram acrescidos de corante para DNA GelRed™ (Biotium, Houston, TX, EUA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) 0,7% (m/v) preparado com tampão TBE (Tris/Borato/EDTA). A corrida eletroforética foi realizada em cuba contendo tampão TBE, sob corrente de 75 V, por aproximadamente 2 h e 15 min. Após a corrida, o perfil plasmidial foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

Curva de crescimento e teste de atividade antagonista do transconjugante

Com base nos testes de atividade antagonista, pelo teste de difusão em sobrecamada, e perfil eletroforético em gel de agarose 0,7%, a amostra transconjugante 9 foi escolhida para a avaliação da síntese de substância antagonista em relação ao tempo de cultivo. A amostra escolhida foi cultivada em TSA, a 37°C, por 24 h, em aerobiose. Colônias obtidas foram transferidas para caldo TSB e incubadas nas mesmas condições, por 12 h. A cultura foi ajustada em espectrofotômetro com absorbância de 625 nm, leitura de 0,08 a 0,10, fracionada em tubos pré-identificados e incuba. Em seguida, a amostra do tubo 1 foi submetida a leitura da densidade óptica, uma alíquota da cultura foi centrifugada e o

sobrenadante avaliado pelo teste de difusão em sobrecamada e titulação [18]. Uma outra alíquota foi diluída em salina 0,85%, 100 μL da diluição 10^{-9} foi plaqueada, em duplicata, em meio TSA e incubadas. Os mesmos passos foram realizados para os demais tubos, respeitando o intervalo de tempo, 20 min entre cada tubo, por 9 h. A leitura da curva de crescimento foi realizada pela contagem do número de colônias em relação ao tempo e a síntese de composto(s) antagonista(s) foi determinada durante a curva de crescimento bacteriano.

Titulação da substância antagonista

Os tubos obtidos do ensaio de curva de crescimento e produção de substância antagonista foram submetidos a diluições seriadas em água ultrapura e 10 µL de cada diluição foram depositados sobre camada de TSA. Após exposição a vapor de clorofórmio e evaporação do clorofórmio residual, por 30 min cada, teste de difusão em sobrecamada foram realizados. O título, definido como a recíproca da maior diluição que resulta em um halo límpido de inibição da amostra reveladora, foi determinado. Em seguida, a atividade antibacteriana foi calculada e expressa em unidades arbitrárias (UA).mL^{-1}, empregando-se a fórmula “UA = título x 1000 µL/v(µL) [2; 8; 18; 19].

3 | RESULTADO

Escolha da amostra receptora para o ensaio de conjugação

Com base no ensaio de difusão em sobrecamada, para a avaliação da ação antagonista, *E. coli* ATCC 25922 foi escolhida como receptora para o teste de conjugação. A amostra não foi ativa contra *S. sonnei* SS9 e *S. sonnei* SS12 e também não foi inibida por *S. sonnei* SS9 (TAB. 1). A escolha da amostra receptora é um passo importante para a pesquisa de plasmídios conjugativos que possam codificar a produção de substância(s) antagonista(s), e resistência antimicrobiana aos fármacos.

Antibiograma

A análise fenotípica, por antibiograma, evidenciou a resistência de *S. sonnei* SS9 aos antimicrobianos trimetroprima e ampicilina, enquanto que *E. coli* ATCC 25922 foi suscetível aos mesmos.

Produtora de substância antagonista	Reveladora da expressão de antagonismo				
	S. sonnei SS9[b]	*S. sonnei* SS12	*S. flexneri* ATCC 12022	*E. coli* K12 Row	*E. coli* ATCC 25922
E. coli K12 Row[a]	- [c]	-	NT	NT	NT
E. coli ATCC 25922	-	-	NT	NT	NT
S. flexneri ATCC 12022	-	+++ [e]	NT	NT	NT
S. sonnei SS9	NT[f]	+++	+[d]	+++	-

[a], amostras avaliadas como produtoras de substância antagonista; [b], amostras testadas como reveladoras da expressão de antagonismo; [c], ausência de atividade antagonista; [d], halo de inibição pequeno e nublado; [e] , halo de inibição grande e límpido; [f] , não testado.

Tabela 1: Avaliação da atividade antagonista e suscetibilidade celular frente à substância antagonista para seleção de uma amostra receptora para teste de conjugação.

Conjugação

No ensaio, apenas as colônias de *E. coli*, que são lactose positivas, foram consideradas. A conjugação entre *S. sonnei* SS9 e *E coli* ATCC 25922 com transferência do plasmídio que codifica resistência a ampicilina foi observada a partir de 15 min. Isolados de *E. coli* transconjugante selecionados também mostraram resistência a trimetropima. No meio sem antimicrobiano, o número de colônias lac^+ e lac^- foi incontável, o que inviabilizou o emprego deste ensaio.

Atividade antagonista das células transconjugantes

O teste de difusão em sobrecamada para avaliação de expressão antagonista pelas amostras de *E. coli* ATCC 25922 transconjugantes recuperadas do meio com ampicilina apresentou resultado positivo para algumas amostras (FIG. 1). O dado demonstra a transferência horizontal, por conjugação, dos plasmídios que conferem as características fenotípicas de resistência à antibiótico e atividade antagonista contra SS12.

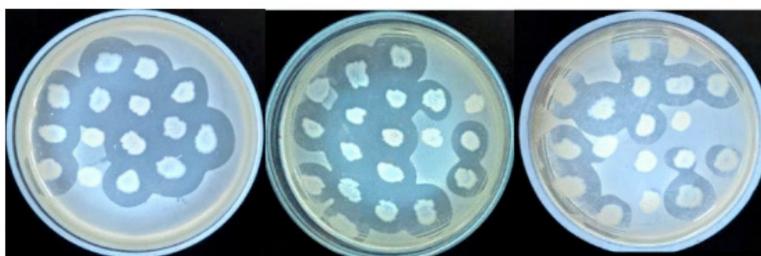



Figura 1. Atividade antagonista de amostras transconjugantes.Halos de inibição produzidos pelas amostras transconjugantes de *E. coli* ATCC 25922 recuperadas de meio com ampicilina, contra a amostra reveladora SS12.

Eletroforese

O perfil plasmidial das amostras é apresentado na FIG. 2. A amostra *S. sonnei* SS9 apresentou quatro bandas com massas moleculares distintas, quais sejam: superior a 10.000 pb e aproximadamente 5.000 pb, 4.000 pb e 3.000pb. A amostra receptora apresentou perfil díspar da amostra produtora, com exceção de uma banda com massa molecular superior a 10.000 pb, é também observado duas bandas superiores a 10.000 pb e outras duas com cerca de 2.500 pb e 1.500 pb, respectivamente. As bandas 2 e 3 de SS9 foram observadas em todas as amostras transconjugantes, enquanto a banda 4 foi visualizada apenas em algumas amostras. O perfil eletroforético comprova a eficiência da transferência por conjugação dos plasmídios.

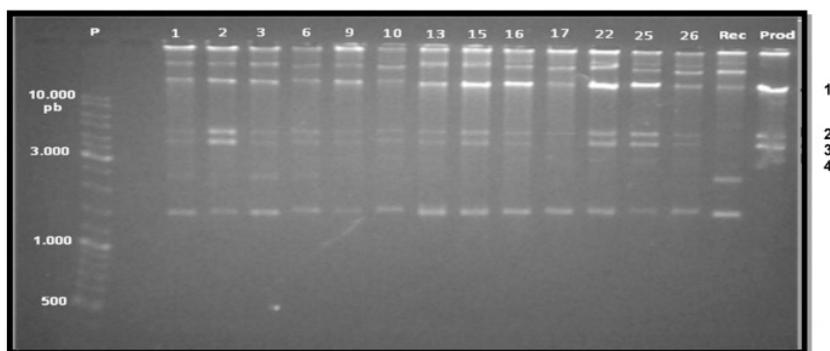



Figura 2. Perfil plasmidial das amostras produtora, reveladora e transconjugantes.

P, padrão de massa molecular (GeneRuler™ DNA Ladder Mix # SM0331/2/3); 1 a 26, transconjugantes; Rec, amostra receptora, *E. coli* ATCC 25922; Prod produtora, *S. sonnei* SS9.

Curva de crescimento e teste de atividade antagonista do transconjugante

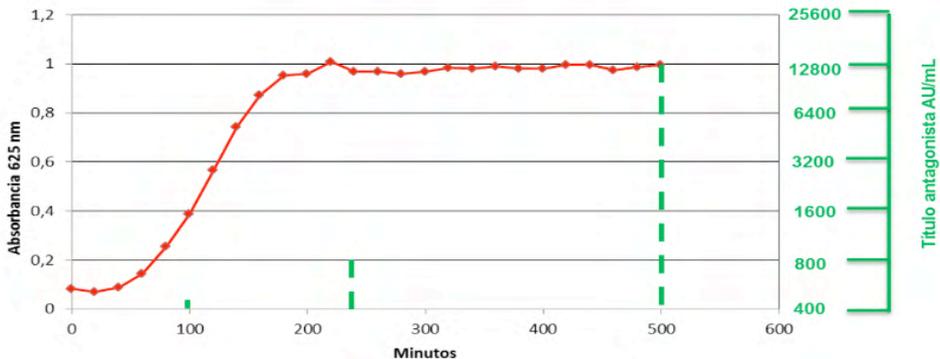
A amostra transconjugante 9, avaliada em relação a curva de crescimento bacteriano e a produção de substâncias antagonistas, apresentou início das fases exponencial e estacionária aos 60 e 180 min, respectivamente. A presença no meio extracelular da(s) substância(s) antagonista(s) iniciou, durante a fase exponencial, a 1h 40 min, com título 400 UA/mL com presença de halos de inibição pouco nítidos. Às 4 h o título antagonista foi de 800 UA/mL com halos ainda pouco nítidos. O melhor resultado da ação inibitória foi observado durante a fase estacionária, a partir das 8h 20 min, com 400 UA/mL em halos límpidos e 12.800 UA/mL com halos menos nítidos (FIG. 3 e 4).

Curva de crescimento e título antagonista da amostra transconjugante 9, *E. coli* ATCC 25922 conjugada com plasmídio(s) de *S sonnei* SS9 produtora de substâncias antagonistas.

Figura 3. Curva de crescimento bacteriano e produção de substância(s) antagonista(s).

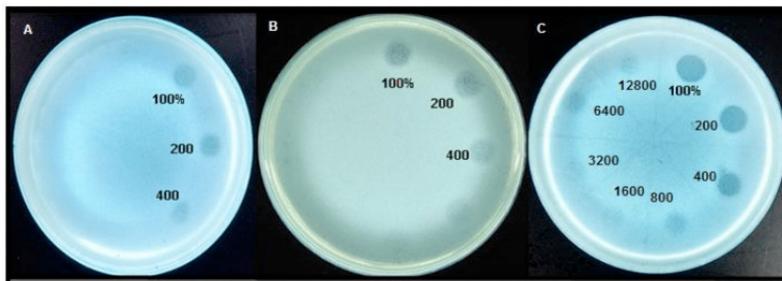



Figura 4. Produção de substância(s) antagonista(s) sintetizada pelo transconjugante 9 durante a curva de crescimento bacteriano.

Atividade e título antagonista do transconjugante 9, contra a amostra reveladora SS12. **A,** Início da atividade antagonista e título de 400 UA/mL da amostra recuperada na fase lag, com 1h 40min de cultivo; **B,** atividade e título antagonista de 800 UA/mL da amostra obtida após 4h de cultivo; **C,** Atividade e título antagonista de 12.800 UA/mL da amostra recuprerada às 8h e 20min de cultivo.

4 | DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Relatos recentes demonstram preocupação mundial do surgimento de isolados de *Shigella* spp. (MDR) e (XDR), incluindo *S. sonnei* [29]. A amostra *S. sonnei* SS9 é resistente aos antimicrobianos trimetropilma e ampicilina, sendo o primeiro a droga de escolha pelo Ministério da Saúde Brasileiro no combate a shigelose. Os genes de resistência podem ser transferidos, por conjugação, para outras bactérias, inclusive de gênero distinto da amostra de origem. Após o ensaio de conjugação a amostra transconjugante selecionada demostrou a característica fenotípica de resistência aos mesmos fármacos. Essa transferência plasmidial também pode ser observada pelo perfil eletroforético das amostras *S. sonnei* doadora, *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* transconjugante. A transferência de plasmídio que codifica resistência a ampicilina foi observada há partir 15 minutos. Watanabe & Fukasawa (1960) também relataram a transferência de resistência a antimicrobiano no mesmo período de

tempo. Resultados semelhantes também foram reportados por Yah (2010), que observou a transferência de plasmídio conjugativo que codificava resistência antimicrobiana, inclusive à ampicilina, entre amostras de *Shigella* e *E. coli*.

Como visto, é crescente o perfil de resistência à antibióticos, o que demostra a necessidade do desenvolvimento de outros compostos que possam atuar contra esses microrganismos. Além da síntese de moléculas que conferem resistência, SS9 também produz substância(s) com capacidade antagonista contra outro isolado da mesma espécie, SS12. Após o ensaio de conjugação entre *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC25922 foi demostrados que os genes que codificam a(s) substância(s) estão contidos em plasmídio(s) conjugativo(s). A curva de crescimento e produção de substância antagonista demostrou que a amostra *E. coli* transconjugante 9 iniciou a síntese dessa molécula durante a fase exponencial e o melhor título antagonista contra o isolado clínico SS12 foi observado durante a fase estácionaria. A substância antagonista confere a amostra que a produz um fator de virulência por atuar contra outras bactérias e assim contribuir na instalação e permanência em um novo habitat [18].Com base na sua capacidade antagonista contra o agente etiologico da shigelose, essa molécula pode, no futuro, dispertar interesse como um modelo para a produção de fármaco.

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), proc. n° CBB-APQ-02068-15, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG), Brasil.

REFERÊNCIAS

1. BARRY, E. M.; PASETTI, M. F.; SZTEIN, M. B.; FASANO, A.; KOTLOFF, K. F.; LEVINE, M. M. **Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research**. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*,v.10, p. 245–255, 2013.

2. BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISET, Y.; PEDROCHE, J.; MÉTRO, F.; PREVOST, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. **Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag.** *J. Appl. Microbiol.*, v. 101, p. 837-848, 2006.

3. BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINS T. D. Bacteriocin production by strains of ***Bacteroides*** isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.11, p.718-724, 1977.

4. Clinical And Laboratory Standards Institute. *M100-S15:* **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio: norma aprovada.** v. 23, 2003, p.177.

5. Clinical And Laboratory Standards Institute. *M100:* **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** v. 38, ed. 28, 2018. p.296.

6.DUGGAN, G. M.; MOSTOWY, S. Use of zebrafish to study ***Shigella*** infection. *Dis Model Mech.*, v.11, p.1-11, 2018.

7. DUPONT, H. L.; LEVINE, M. M.; HORNICK, R. B.; FORMAL, S. B. **Inoculum size in Shigellosis and implications for expected mode of transmission.** *J Infect Dis.*, v. 159, p. 1126-1128, 1989.

8. FARIAS, L. M.; TOTOLA, A. H.; MIRANDA, C. M. S.; CARVALHO, M. A. R. **Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata.*** *Res. Microbiol.*, v.145, p.9-16, 1994.

9. GAUFIN, T.; BLUMENTHAL, J.; RAMIREZ-SANCHEZ, C.; MEHTA, S.; PRIDE, D. T.; FIERER, J.; JENKS, J. D. **Antimicrobial-Resistant *Shigella* spp. in San Diego, California, USA, 2017–2020**. Emerg. Infect. Dis, v. *28*, p.1110-1116, 2022.

10. HALIMEH, F. B.; RAFEI, R.; OSMAN, M.; KASSEM, II.; DIENE, S.M.; DABBOUSSI, F.; ROLAIN, J.M.; HAMZE, M. **Historical, current, and emerging tools for identification and serotyping of *Shigella***. *Braz J Microbiol.* v. 52, p.2043-2055, 2021.

11.JENNISON, A. V.; VERMA, N.K. ***Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development.** *FEMS Microbiol.Rev.*,v. 28, p. 43-58, 2004.

12. KHAN, S.; SINGH, P.; ANSARI, M.; ASTHANA, A. **Isolation of *Shigella* species and their resistance patterns to a panel of fifteen antibiotics in mid and far western region of Nepal.** *Asian Pac J Trop Dis.*, v.4, p.30-34, 2014.

13. KOTLOFF, K. L., RIDDLE, M. S., PLATTS-MILLS, J. A., PAVLINAC, P., & ZAIDI, A. K. M. **Shigellosis.** *Lancet.* v.391, p.801-812, 2018.

14.LEDERBERG, J.; E. M. LEDERBERG. **Replica plating and indirect selection of bacterial mutants**. *J. Bacteriol.* v.63, p. 399-406, 1952.

15. MAHMOUD, R. Y.; LI, W.; ELDOMANY, R. A.; EMARA, M.; YU, J. **The *Shigella* proU system is required for osmotic tolerance and virulence.** *Virulence.* v.24, p.1-13, 2016.

16. MARTEYN, B. S.; GAZI, A. D.; SANSONETTI, P. J. *Shigella*: **A model of virulence regulation in vivo**. *Gut Microbes,* v. 3, p. 104-120, 2012.

17. MCCRICKARD, L. S.; CRIM, S. M.; KIM, S.; BOWEN, A. Disparities in severe shigellosis among adults - Foodborne diseases active surveillance network, 2002-2014. *BMC Public Health.* v. 18, p.1-8, 2018.

18. MOREIRA, J. S. **Caracterização da primeira microcina e de outras bacteriocinas sintetizadas por *Shigella sonnei***. 242f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.

19. MOREIRA, J. S. **Purificação de substâncias antibacterianas e estudo de plasmídios colicinogênicos de *Shigella sonnei*** 189f. Tese (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2018.

20. NIYOGI, S. K. **Shigellosis.** *J. Microbiol.,* v. 43, p. 133-143, 2005.

21. NUNES, R. C. M.; MAGALHÃES, P. P.; PENNA, F. J.; NUNES, J. M. M.; MENDES E. N. **Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials**. *J Pediatr.,* v.88, p.125-128, 2012.

22. PHALIPON, A.; SANSONETTI, P.J. ***Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival?** *Immunol Cell Biol.*, v. 85, p.119–129, 2007.

23. RILEY, A. M.; WERTZ, J. E. **Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application.** *Rev. Microbiol.*, v.56, p.117–137, 2002.

24. SOUSA, M. A. B.; MENDES, E. N.; APOLÔNIO, A. C. M.; FARIAS, L. M.; MAGALHÃES, P. P. **Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea.** APMIS: *Acta Pathol. Microbiol.Immunol.Scand.*, v. 118, p. 125-135, 2010.

25. SOUSA, M. A. B.; FARIAS, L. M.; OLIVEIRA, P. L.; MOREIRA, J. S.; APOLÔNIO, A. C. M.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M.; MENDES, E. N.; MAGALHÃES, P. P. **Antagonistic activity expressed by *Shigella sonnei* identification of a putative new bacteriocin**. *Men Inst Oswaldo Cruz,* v.108, p.724-729, 2013.

26. SREENIVASAN, S.; KALI, A.; PRADEEP, J. Multidrug resistant ***Shigella flexneri*** infection simulating intestinal intussusception. *J Lab Physicians.* v. 8, p. 55–57, 2016.

27. WATANABE, T.; FUKASAWA, T. **Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. I transfer of resistance factors by conjugation. *J Bacteriol.,*** v.81, p.668-678, 1960.

28. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhoea and dysenteric mortality.** Department of vaccines and biologicals. Geneva, Switzerland, 1999.

29. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Extensively drug-resistant ***Shigella sonnei*** infections - Europe - European Region (EURO). Disease Outbreak News, 2022.

30. YAH, C. S. **Plasmid-Encoded Multidrug Resistance: A Case study of *Salmonella* and *Shigella* from enteric diarrhea sources among humans**. *Biol Res.;* v. 43: p.141-148, 2010.

CAPÍTULO 2

PURIFICATION OF MULTIFUNCTIONAL SUBSTANCES ACTIVE AGAINST *Shigella sonnei*

Data de aceite: 28/09/2022

Jaqueline S. Moreira
Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Jamil S. Oliveira
Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Marcelo P. Bemquerer
EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Brasília, DF, Brazil

Ricardo A. Machado-de-Ávila
Unidade de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

Daniel M. Santos
Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brazil

Desielle C. Matos
Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Bruna T. Maria
Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Paula P. Magalhães
Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Luiz M. Farias
Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

ABSTRACT: *Shigella* is the etiological agent of shigellosis. Antimicrobial peptides and proteins are biologically active substances produced by prokaryotes and eukaryotes that may present antagonistic activity against a wide range of microorganism. In this study, the intracellular extract of a *Shigella sonnei* isolate was precipitated with 75% ammonium sulfate and purified by sequential chromatography steps using ion exchange, molecular exclusion, and reversed-phase columns. Analysis by mass spectrometry identified three substances with molecular masses of 7.2, 9.2 and 10.7 kDa, active against another *Shigella sonnei* isolate. The amino acid sequences of the active substances were evaluated with the aid of BLAST - P software. The antagonistic substances were identified, respectively, as 50S ribosomal protein L29 of *Escherichia coli*, DNA-binding protein HU-beta and ribosome hibernation promoting factor both of *Shigella sonnei*. Data demonstrated that S*higella sonnei* synthesizes three antimicrobial substances that present other classical functions, active against another isolate of the same species.

KEYWORDS: *Shigella sonnei*, shigellosis, multifunctional substances, antimicrobial peptides and proteins.

INTRODUCTION

Shigella is a genus of Gram-negative enteric pathogens including four species, *Shigella sonnei, S. flexneri, S. dysenteriae*, and *S. boydii*, that are heterogeneously worldwide distributed (Puzari et al. 2018; Sheikh et al. 2019). All of them are agents of shigellosis, a disease that affects about 165 million people around the world with approximately one million deaths per year, mostly children from underdeveloped regions (González-Torralba et al. 2018; McCrickard et al. 2018; Aslam and Okafor, 2019). When infected, the individual may present from watery diarrhea to a severe inflammatory disease, with abscesses and ulcerations in the mucous intestinal membrane. The infection is also characterized by abdominal pain, anorexia, vomiting, fever, and mucous bloody feces (Niyogi 2005; Phalipon and Sansonetti, 2007; Marteyn et al. 2012; Carayol and Nhieu, 2013; Nygren et al. 2013; The et al. 2016; Kotloff et al. 2018; Aslam and Okafor, 2019). In some cases, the patient may develop sequelae after infection healing, such as arthritis, sepsis, seizures, and haemolytic uremic syndrome (Duggan and Mostowy, 2018). The development of resistance to antibiotics by *Shigella* is an emerging problem and according the World Health Organization (WHO), *Shigella* is among the twelve pathogens that require urgent intervention, such as discovery and development of new antibiotics targeting the organism (WHO report, 2017; Duggan and Mostowy, 2018; Micoli et al., 2022).

Antimicrobial proteins and peptides may be synthesized by several organisms including prokaryotes and both upper and lower eukaryotes (Wilson et al. 1999; Nuding et al. 2007; Meyer-Hoffert et al. 2008; Hegedus and Marx, 2013; Saggese et al. 2022). Examples of such compounds synthesized by ribosomes active against bacteria, fungi, and viruses include defensins produced by vertebrates, arthropods, and plants (Bulet et al. 1999; Ganz, 2003; Wilson et al. 2016); cecropin (Ouyang et al. 2015) and drosomycin (Bulet et al. 1999 ; Lee et al. 2002a) synthesized by insects; magainin II and ranatuerin 2Mb produced by amphibians (Rollins-Smith, 2009); bacteriocins expressed by Gram-negative (Rebuffat 2011; Micenková et al. 2016) and Gram-positive bacteria (Rea et al. 2011; Ha, 2016); histone-like proteins produced by fishes (Park et al. 1996; Noga et al. 2001; Bergsson et al. 2005), toads (Cho et al. 2009), and bacteria (Carvalho et al. 2010); ribosomal proteins synthesized by mice (Meyer-Hoffer et al. 2008), fishes (Bergsson et al. 2005), and bacteria (Putsep et al. 1999; Lee et al. 2002a,b; Carvalho et al. 2010, 2018).

Antimicrobial peptides (AMPs) are generally substances made up of as many as 100 amino acids with cationic or anionic charges, although anionic peptides are less commonly reported (Bahar and Ren, 2013; Leite et al. 2019). The attraction between the antimicrobial peptide and the target bacterium culminates in formation of electrostatic bonds between

either the anionic or the cationic portions of the peptide with the bacterium (Brogden, 2005). Thus, anionic AMPs are generally rich in glutamine and aspartic acid and some of the use metal ions, as zinc, to create cationic salt bridges with negatively charged substances of microbial membranes, which allows its penetration by the membrane and acting against intracellular components, such as ribosomes (Jeżowska-Bojczuk and Stokowa-Sołtys, 2018). Already the cationic AMPs are attracted to the anionic structures of the bacterial wall, such as anionic phospholipids and phosphate groups on lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria and the teichoic acids on the surface of Gram-positive bacteria (Brogden, 2005; Jenssen et al. 2006). After this contact, it translocate the bacterial cell wall and may act against the bacterial target, which may be the cytoplasmic membrane and intracellular components (Brogden, 2005; Jenssen et al. 2006; Bahar and Ren, 2013) In this study, we purified three antibacterial substances produced by *S. sonnei* that express antagonism against an isolate of the same species.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

Two strains of *S. sonnei*, named as SS9 and SS12 were included in the study as producer of antagonist substance(s) and indicator of antagonism expression, respectively. They were obtained from fecal specimens of children presenting acute diarrhea who searched for assistance at Hospital Infantil João Paulo II, Belo Horizonte, Brazil (Sousa et al. 2010). Bacterial isolates have been kept in Brucella Broth (BBL, Sparks, MD, USA) added with 10% glycerol (v/v) at -80 °C. Before use, they were cultivated for three consecutive days in Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, Sparks, MD, USA) at 37 °C, for 24 h, in aerobiosis (Sousa et al. 2010).

Isoantagonist activity assay

Antimicrobial activity of SS9 against SS12 was confirmed by the double-layer diffusion test (Farias et al. 1994; Sousa et al. 2010). Ten microliters of SS9 culture was spotted onto the surface of TSA. After drying of the drop the plate was incubated at 37 °C, for 24 h, in aerobiosis. The viable cells were eliminated with chloroform vapor for 30 min followed by keeping the plate partly open, in sterile environment, for evaporation of residual chloroform. The plate was covered with 3.5 mL of semisolid TSA (TSB + 0.7% agar) added with 10 μL of a 24h culture of the SS12 and incubated as described above. The positive result for isoantagonistic action was determined by observation of an inhibition halo around the spot of SS9.

Intracellular protein extraction

Colonies of *S. sonnei* SS9 obtained from the third day of cultivation were inoculated

in 60 mL of Tryptic Soy Broth (TSB; Difco) and incubated at 37 ºC, for 24 h, under aerobic conditions. After this period, the culture was added to 1,740 mL of TSB and incubated at 37 °C, in aerobiosis. After 12 h, the culture was centrifuged at 16,200 *g*, for 30 min, at 4 °C and the sediment was suspended in 20 mmol.L^{-1} Tris-HCl buffer, pH 8.0, centrifuged and resuspended in the same buffer. The suspension was sonicated at 50 W for 12 cycles of 1 min with 30 s intervals, in an ice bath. After that, the material was centrifuged and the supernatant was kept in an ice bath and undergone protein precipitation by means of ammonium sulfate addition (concentrations 0-30 and 30-75% p/v; Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil). After centrifugation at 29,830 *g*, for 30 min, at 4° C sediments were dissolved in the same buffer, generating the intracellular extracts named as C-30 and C-75. C-75 was dialyzed against the same buffer at 4°C overnight, aliquoted, and kept at -80 °C (Moreira, 2011, Sousa et al. 2013).

Evaluation of antagonism expression, titration and determination of protein concentration

Antagonism expression was evaluated by the double-layer diffusion test. A 10 µL aliquot of C-75 was dripped onto the surface of TSA. After exposure to chloroform vapor for 30 min and evaporation of residual chloroform, 3.5 mL of semisolid TSA added with 10 *µ*L of a 24 h culture of the indicator strain was poured over TSA layer. After incubation at the same conditions described before, the presence of inhibition zones was considered indicative of antagonistic activity. Tris-HCl buffer and ultrapure water were employed as controls (Booth et al. 1977; Sousa et al. 2013). The assay was used to determine the antagonistic activity of the samples obtained from the purification steps.

C-75 and the pools of the fractions of chromatography on ion exchange and molecular exclusion columns were titrated through serial dilutions in ultrapure water and tested for antagonistic activity. Results were expressed as arbitrary units per milliliter (AU.mL^{-1}) which is defined as the highest dilution that results in a clear zone of inhibition of the indicator strain (Batdorj et al. 2006).

Protein concentration of C-75 and the pools of the fractions of chromatography on ion exchange and molecular exclusion columns were determined according to the methodology described by Bradford (1976) using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as standard.

Purification of antibacterial peptides

C-75 was submitted to sequential chromatography steps as specified. The first purification step was performed in a Mono-Q™ ion exchange column, Tricorn 5/50 GL™ (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) coupled to a FPLC system (Pharmacia, GMI, Ramsey, MN). The column was previously equilibrated in 20 mmol L^{-1} Tris-HCl buffer, pH 8.0, at a flow rate of 60 mL.h^{-1}. For elution, the same buffer with addition of 1 M of NaCl was used in a linear gradient from 0-100% in 60 min with detection at 280 nm. Fractions were

collected, lyophilized, re-suspended in ultrapure water, and assessed for antagonist activity. Selected fractions were combined into a pool that was submitted to a Superose 12HR 10/30 molecular exclusion column (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) coupled to a FPLC system. The mobile phase was Tris-HCl buffer, pH 8.0, at a rate of 30 $mL.h^{-1}$. Fractions were monitored at 280 nm. The fractions were lyophilized, solubilized, and tested concerning their antagonism expression. Selected pools of fractions were separately chromatographed in a C8-Supelco reversed-phase column (4,6 mm x 25 cm, 5 μm) coupled to an HPLC (Shimadzu Prominence, Kyoto, Japan) system. The column had been previously eluted with H_2O:ACN:TFA (20:80:0.1, by volume) and equilibrated with H_2O:TFA (100:0.1, by volume). The fractions were eluted with at a flow rate of 1.0 $mL.min^{-1}$, with the following solvent conditions: H_2O:TFA (100:0.1) for 10 min, followed by a linear gradient to H_2O:ACN:TFA (20:80:0.1) during 30 minutes and an isocratic condition at H_2O:ACN:TFA (20:80:0.1) for 40-45 min. The fractions were monitored at ƛ 220 and ƛ 280 nm. They were lyophilized, solubilized, and tested concerning their antagonism expression. Selected fraction and pool were separately injected into a C18-Sephasil™ Peptide reversed-phase column (4,6 mm x 25 cm x 5 μm) coupled to HPLC, following the same protocol described for C8 column. Active fractions analyzed by mass spectrometry (Moreira, 2011).

Mass spectrometry

Fractions and purified proteins were lyophilized, and solubilized in 0.1 % TFA solution. Then, 1 μL of protein solution was mixed to 3 μL of matrix solution (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, α-CHCA,), which was prepared at 50 mmol/L in in H_2O:ACN:TFA (1:1:0.3, v:v:v). This mixture spotted onto the MALDI acquisition plate (MTP Anchor Chip 384 x 600, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) that was kept at room temperature. For determining the protein molecular mass, an Autoflex® III MALDI-TOF/TOF spectrometer (Bruker Daltonics) was operated in the positive linear mode. For external linear calibration, either Peptide Calibration Standard II, or Protein Calibration Standard I (Bruker Daltonics) were employed. Mass analysis ranged from m/z 500 to m/z 4000 for peptides and from m/z 4,000 to m/z 20,000 for proteins, using the respective voltage parameters determined by Bruker Daltonics. Partial peptide sequences employed for protein identification were obtained by in-source dissociation (ISD-MALDI) in an Ultraflex III mass spectrometer (Bruker Daltonics). As matrix, a solution of 1,5-diaminonaphthalene at 60 mmol/L was prepared in H_2O:ACN:TFA (1:1:0.3, v:v:v). This solution (1 μL) was mixed with an aqueous solution (1 μL) of the purified proteins and spotted onto the MALDI acquisition plate. The following analytical voltage parameters were employed: ion source 1, 25.00 kV; ion source 2, 22.40 kV; lens, 9.40 kV; reflector, 26.50 kV; reflector 2, 13.46 kV. The m/z values are not calibrated. One analyzed the results by using the Flex Analysis program (Bruker Daltonics).

Amino acid sequencing of the antagonist substances

The sequence of amino acid residues of the purified antibacterial substances was

determined by fragmentation Lift and ISD on a mass spectrometer. Sequences obtained were analyzed by comparison with known protein sequences using the BLAST-P software.

RESULTS AND DISCUSSION

S. sonnei SS9 is able to produce proteic antagonist substances active against the same species. Following lysis by sonication and protein precipitation, it was possible to recover 23 mL of C-75. The extract was active against SS12, with an antagonistic activity titer 3.60 x 10^{18} AU/mL and a protein concentration of 113 mg/mL. The high titer obtained is important considering that loss of material should be expected as a result of chromatographic processes employed for purification.

C75 was subjected to purification by chromatographic sequential steps. The pools of the selected active fractions obtained from ion exchange and molecular exclusion chromatography were analyzed by titration of the antagonistic action, volume and protein dosage (Tab.1). The same parameters were not analyzed for the samples obtained from reversed-phase chromatography steps due to the reduced amount of material obtained. Forty active fractions were recovered from the ion exchange column. Among them, fractions 1 to 7 that presented positive or neutral liquid charge were pooled and submitted to molecular exclusion chromatography. Among the 25 fractions generated, 14 were active against SS12. Two pools including fractions 2 to 6 and 7 to 9 were subsequently submitted to reserved-phase chromatography. Active fractions named B15 (P1) obtained from pool 2 to 6, C1 to C3 (P2) and C4 to C10 (P3) from pool 7 a 9 were *re-chromatographed in* Sephasil™ Peptide reversed-phase column. The active fractions 35 (F1), 34 (F2) and 34 (F3) generated by this last chromatographic step, originated from P1, P2 and P3, respectively, were eluted in 67%, 64% and 64% acetonitrile, suggesting that they are hydrophobic molecules (Figs. 1, 2, 3).

Mass spectrometry analysis of sample F1 showed a purified active substance with molecular mass of 9,215 Da (Fig. 4). The following partial fifty-two amino acid residues sequence was obtained: **MNKSQLIDKIAAGADISKAAAGRALDAIIASVTESLKEGDDVALVGFGTFAV**. The sequence demonstrated 100% identity and query coverage with DNA-binding protein HU beta from *S. sonnei*, which is composed of 90 amino acid residues (Tab. 2). One must point out that the neither glutamine may be distinguished from lysine nor leucine may be distinguished from its isomer isoleucine in the MALDI mass spectrometry method employed.

The purified active sample F2 corresponded to a substance with a molecular mass of 10,742 Da (Fig. 5). The partial sequencing of the substance identified nineteen amino acid residues correspondent to the sequence **LREFVTAKFAKLEQYFDRI,** which presented 100% identity and query coverage with ribosome hibernation promoting factor from *S. sonnei*, a protein that is constituted of 95 amino acid residues (Tab. 2).

The sample F3 presented a purified substance with molecular mass of 7,271 Da. (Fig. 6). Sequence analysis of seventeen amino acids residues, **SVEELNTELNLNLRKEF**,

identified the substance as 50S ribosomal protein L29 of *Escherichia coli*, which is composed of 63 amino acid residues. The analysis demonstrated 83% identity e 100% query coverage with the reported sequence (Tab.2).

Antimicrobial peptides present from 12 to 100 residues of amino acids which are usually cationic and amphiphilic. Regardless of their mechanism of action, the antibacterial action depends on the contact with the cell membrane promoted by electrostatic and hydrophobic interactions. Therefore, the first contact between the antimicrobial peptide and the target bacteria is given by the electrostatic interactions between the cationic peptide and the negatively charged component found in the bacterial envelope, as the phosphate of lipopolysaccharide and anionic phospholipids of Gram-negative bacteria or the lipoteichoic acid of Gram-positive bacteria. After their first contact, the hydrophobic interactions occur, by the insertion of the antibacterial peptide into the outer membrane of Gram-negative bacteria, which provides a perturbation that promotes the entry of the peptide into the periplasmic space. In the periplasmic space the peptide may integrate with the negatively charged lipids present in the monolayer of the cytoplasmic membrane, or they may cross the membrane and interact with intracellular compounds (Brogden 2005; Jenssen et al; 2006, Bahar and Ren, 2013; Gupta et al. 2014; Seo et al. 2017; Jeżowska-Bojczuk and Stokowa-Sołtys, 2018).

Carvalho et al. (2010) purified a DNA-binding HV histone from *Lactobacillus. sakei* subsp. Sakei 23K supernatant that showed antagonistic action against *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis.* The authors suggest that the antagonistic action of the substance may be due to the interaction of the molecule with DNA structure and replication. Similar results are known in the literature for a histone fragment, denominated as Buforin II, isolated from the gastric tissue of the Asian toad (*Bufo bufo garagrizans*). The molecule is able of crossing the cell membrane of the target bacterium and of strongly interacting with nucleic acids causing bacterial death (Park et al. 2000). Other peptides with antibacterial action derived from histones were also isolated, such as oncorhyncin II, oncorhyncin III, HLP1, and H2B from *Oncorhynchus mykiss* (Rainbow trout); hipposin-I from *Hippoglossus hippoglossus* (Atlantic halibut); and SAMP H1 from *Salmo salar* (Atlantic salmon) (Valero et al., 2013).

Another interesting result was obtained by Mryer-Hoffert et al. (2008). The authors isolated a ribosomal protein (L29) from mouse's lung and small intestine that showed antagonist activity against intestinal and pulmonary microorganisms *L. monocytogenes, Streptococcus pyogenes, E. coli*, and different lineages of *Pseudomonas aeruginosa*. Similar data were obtained by Pidutti et al (2018), that isolated from the extracellular medium of *Lactobacillus salivarius* SGL03 the L27 and L30 ribosomal proteins belonging to 50S subunit that present antagonistc action against *S. pyogenes*, *Streptococcus uberis* and *Enterococcus faecium*. Furthermore, these two substances presented bactericidal action against *S. pyogenes*. Four ribosomal proteins and a translation initiation factor IF-1 peptide

of *L. sakei* were also active against *Listeria* spp., *E. faecalis* and *L. sakei* isolates (Carvalho et al. 2018). In addition, hemoglobin derived peptides Hbβ P1, P2, and P3 obtained from *Ictalurus punctatus* (Channel catfish) showed antibacterial and antiparasitc properties (Ullal et al. 2008). Other hemoglobin derived peptide, denominated as SHβAP, presented antagonist activity against Gram-positive bacteria, such as *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus,* and *Streptococcus iniae* as well as Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *P. aeruginosa, Salmonella enterica, S. sonnei*, and *Vibrio parahaemolyticus* (Seo et al. 2014). Astacin-1, a hemocyanin derived peptide originating from *Pacifastacus leniusculus* (Crayfish) also shows antibacterial action (Lee et al. 2003).

In conclusion, *S. sonnei* SS9 isolate is able to produce three proteic multifunctional compounds that express antimicrobial activity against other *S. sonnei* isolates. These substances may be candidates for new drugs against shigellosis. Other studies to evaluate their mechanism of action, stability, activity against indigenous microbiota and eukaryotic cells, among others, should be performed for verifying the biotechnological potential of these molecules.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), proc. n° CBB-APQ-02068-15, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG), Brazil. To the Laboratório de Proteômica belonging to the Centro de Laboratórios Multiusuários (CELAM) for making the equipment available for viewing the results.

REFERENCES

Aslam A, Okafor CN. *Shigella* (Shigellosis) [Updated 2019 Feb 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2019 Jan-.Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482337/ Accessed 20 april 2019.

Bahar AA, Ren D. (2013) Antimicrobial peptides. Pharm 6:1543-1575.

Batdorj B, Dalgalarrondo M, Choiset Y, Pedroche J, Métro F, Prevost H, Chobert JM, Haertlé T. (2006) Purification and 168 characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. J Appl Microbiol 101:837-848.

Bergsson G, Agerberth B, Jörnvall H, Gudmundsson GH. (2005) Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Febs J 272:4960-4969.

Booth SJ, Johnson JL, Wilkins TD. (1977) Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. Antimicrob Agents Chemother 11:718-724.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

Brogden KA. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat 3:238-250.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Development Comparat Immunol 23:329-344.

Carayol N, Nhieu GTV. (2013) The inside story of *Shigella* invasion of intestinal epithelial cells. Cold Spring Harb Perspect Med 3:1-13.

Carvalho KG, Bambirra FHS, Kruger MF, Barbosa MS, Oliveira JS, Santos AMC, Nicoli JR, Bemquerer MP, Miranda A, Salvucci EJ, Sesma FJM, Franco BDGM. (2010) Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. J Ind Microbiol Biotechnol 37:381–390.

Carvalho KG, Bambirra FHS, Nicoli JR, Oliveira JS, Santos AM, Bemquerer MP, Miranda A, Franco BD. (2018) Characterization of multiple antilisterial peptides produced by sakacin P-producing *Lactobacillus sakei subsp. sakei* 2a. Arch Microbiol 200:635-644.

Cho JH, Sung BH, Kim SC. (2009) Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. Biochim Biophys acta (*bba)*-Biomem 1788:1564-1569.

Duggan GM, Mostowy S. (2018) Use of zebrafish to study *Shigella* infection. Dis Model Mech11:1-11.

Farias LM, Totola AH, Miranda CMS, Carvalho MAR, Damasceno CAV, Tavares CAP, Cisalpino EO, Vieira EC. (1994) Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. Res Microbiol 145:9-16.

Ganz T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Ver Immunol 3:710-720.

González-torralba A, García-esteban C, Alós JI. (2018) Enteropatógenos y antibióticos. Enferm Infecc Microbiol Clin 36:47-54.

Gupta A, Gupta R, Kurwardkar S. (2014) Liposome-encapsulated antimicrobial peptides: Potential infectious diseases therapy. In: Soni S, Salhotra A, Suar M (eds) Handbook of research on diverse applications of nanotechnology in biomedicine, chemistry, and engineering, 1st edn. IGI Global, Pensilvânia, pp 301-332.

Ha EM. (2016) *Escherichia coli*-derived uracil increases the antibacterial activity and growth rate *of Lactobacillus plantarum*. J Microbiol Biotechnol 26:975-987.

Hegedüs N, Marx F. (2013) Antifungal proteins: more than antimicrobials? Fungal Biol Rev 26:132-145.

Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. (2006) Peptide antimicrobial agents. Clil Microbiol Ver 19:491–511.

Jeżowska-Bojczuk M, Stokowa-Sołtys K. (2018) Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. Eur J Med Chem 143:997-1009.

Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. (2018) Shigellosis. Lancet. 391:801-812.

Lee DG, Park Y, Kim HN, Kim HK, Kim PI, Choi BH, Hahm KS. (2002a). Antifungal mechanism of an antimicrobial peptide, HP (2–20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 against *Candida albicans.* Biochem Biophys Res Commun 291:1006-1013.

Lee DG, Kim HN, Park Y, Kim HK, Choi BH, Choi CH, Hahm KS. (2002b) Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, HP (2–20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1. Biochem Biophys Acta 1598**:**185-194.

Lee SY, Lee BL, Soderhall K. (2003) Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J Biol Chem 278:7927-7933.

Leite ML, Sampaio KB, Costa FF, Franco OL, Dias SC, Cunha NB. (2019) Molecular farming of antimicrobial peptides: available platforms and strategies for improving protein biosynthesis using modified virus vectors. An Acad Bras Cienc 91:1-23.

Marteyn BS, Gazi AD, Sansonetti, PJ. (2012) *Shigella*: A model of virulence regulation in vivo. Gut Microbes 3:104-120.

Mccrickard LS, Crim SM, Kim S, Bowen A. (2018) Disparities in severe shigellosis among adults - Foodborne diseases active surveillance network, 2002-2014. BMC Public Health 18:1-8.

Meyer-Hoffert U, Hornef M, Henriques-Normark B, Normark S, Andersson M, Pütsep K. (2008) Identification of heparin/heparan sulfate interacting protein as a major broad-spectrum antimicrobial protein in lung and small intestine. Faseb J 22:2427-2434.

Micenková L, Bosák J, Štaudová B, Kohoutová D, Čejková D, Woznicová VMV, Ševčíková A, Bureš J, Šmajs D. (2016) Microcin determinants are associated with B2 phylogroup of human fecal *Escherichia coli* isolates. Microbiol Open. 5:490-498.

MICOLI F, NAKAKANA U N, BERLANDA S F.(2022) Towards a Four-Component GMMA-Based Vaccine against *Shigella*. Vaccines. 10: 1-14.

Moreira JS (2011) Extração, purificação e caracterização de substância antagonista produzida por *Shigella sonnei*. Monografia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Niyogi SK. (2005) Shigellosis. J Microbiol 43:133-143.

Noga EJ, Fan Z, Silphaduang U. (2001) Histone-like proteins from fish are lethal to the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum.* Parasitol 123:57-65.

Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Stange EF. (2007) Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. Gut 56:1240-1247.

Nygren BL, Schilling KA, Blanton EM, Silk BJ, Cole DJ, Mintz ED. (2013) Foodborne outbreaks of shigellosis in the USA, 1998–2008. Epidemiol Infect 141:233-241.

Ouyang L, Xu X, Freed S, Gao Y, Yu J, Wang S, Ju W, Zhang Y, Jin F. (2015) Cecropins from *Plutella xylostella* and their interaction with *Metarhizium anisopliae*. PloS one10:1-16.

Park CB, Kim MS, Kim SC. (1996) A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans.* Biochem Biophys Res Commun 218:408-413.

Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC. (2000) Structure activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. Proc Nat Acad Sci USA 97:3245–3250.

Phalipon A, Sansonetti PJ. (2007) *Shigella*'s ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? Immunol Cell Biol 85:119-129.

Pidutti P, Federici F, Brandi J, Manna L, Rizzi E, Marini U, Cecconi D. (2018) Purification and characterization of ribosomal proteins L27 and L30 having antimicrobial activity produced by the *Lactobacillus salivarius* SGL03. J Appl Microbiol. 124:398-407.

Pütsep K, Brändén CI, Boman HG, Normark S. (1999) Antibacterial peptide from *H. pylori.* Nat 398: 671-672.

Puzari M, Sharma M, Chetia P. (2018) Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. J Infect Public Health. 11:451-454.

Rea MC, Ross RP, Cotter PD, Hill C (2011) Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In: Drider D, Rebuffat S (eds) Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications, 1st edn. Springer, New York, pp. 29-53.

Rebuffat S (2011) Bacteriocin from Gram-negative bacteria: A classification? In: Drider D, Rebuffat S (eds) Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications, 1st edn. Springer, New York, pp. 55-71.

Rollins-Smith LA. (2009) The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. Biochim Biophys acta (bba)-Biomem 1788:1593-1599.

SAGGESE A, LUCA Y, BACCIGALUPI L, RICCA E. (2022) An antimicrobial peptide specifcally active against *Listeria monocytogenes* is secreted by *Bacillus pumilus* SF214. BMC Microbiol. 22:1-11.

Seo JK, Lee MJ, Jung HG, Go HJ, Kim YJ, Park NG. (2014) Antimicrobial function of SHβAP, a novel hemoglobin β chain-related antimicrobial peptide, isolated from the liver of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. Fish & Shellfish Immunol 37:173–183.

Seo J, Kim D, Oh R, Park K, Lee I, Cho S, Lee K, Nam B. (2017) Antimicrobial effect of the 60S ribosomal protein L29 (cgRPL29), purified from the gill of pacific oyster, *Crassostrea gigas.* Fish Shellfish Immunol 67:675-683.

Sheikh AF, Moosavian M, Abdi M, Heidary M, Shahi F, Jomehzadeh N, Seyed MS, Saki M, Khoshnood S. (2019) Prevalence and antimicrobial resistance of Shigella species isolated from diarrheal patients in Ahvaz, southwest Iran. Infect Drug Resist 12: 249–253.

Sousa MAB, Mendes EN, Apolônio ACM, Farias LM, Magalhães PP. (2010) Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhea. APMIS 118:125-135.

Sousa MAB, Farias LDM, Oliveira PLD, Moreira JS, Apolonio ACM, Oliveira JS, Santoro MM, Mendes EN, Magalhaes PP. (2013) Antagonistic activity expressed by *Shigella sonnei*: identification of a putative new bacteriocin. Mem Inst Oswaldo Cruz 108:724-729.

The HC, Thanh DP, Holt KE, Thomson NR, Baker S. (2016) The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. Nat Rev Microbiol 14: 235-250.

Ullal AJ, Litaker RW, Noga EJ. (2008) Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). Dev Comp Immunol 32:1301-1312.

Valero Y, Chaves-Pozo E, Meseguer J, Esteban MA, Cuesta A (2013) Biologial role of fish antimicrobial peptides. In: Seong MD, Hak YI (eds) Antimicrobial peptides: properties, functions and role in immune response, 1st edn. Nova Science Publishers, New York, pp.31-60.

Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC. (1999) Regulation of intestinal α-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. Sci 286:113-117.

Wilson SS, Wiens ME, Holly MK, Smith JG. (2016) Defensins at the mucosal surface: latest insights into defensin-virus interactions. J Virol 90:5216-5218.

World Health Organization (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf. Accessed 3 february 2019.

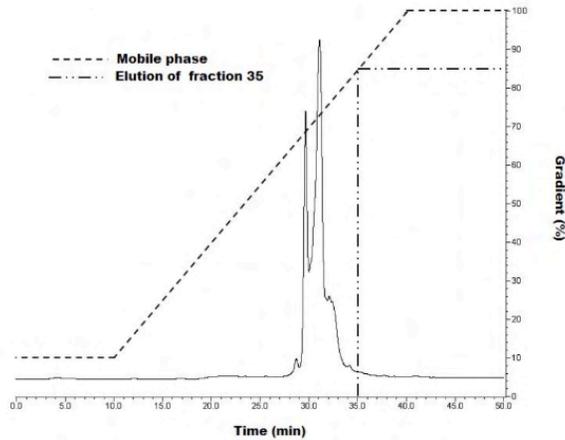



Fig.1 C18-Sephasil™ Peptide reversed-phase column chromatography. The inverse order for obtaining the sample is as follows: fraction B15 (P1) of C8-Supelco reversed-phase chromatography; a pool of fractions 2 to 6 of molecular exclusion chromatography, which pool of fractions 1 to 7 of ion exchange chromatography; intracellular extract of *S. sonnei* SS9 precipitated at 75% ammonium sulfate. The fractions were eluted with at a flow rate of 1.0 mL/min, with the following solvent conditions: H_2O:TFA (100:0.1) for 10 min, followed by a linear gradient to H_2O:ACN:TFA (20:80:0.1) during 30 minutes and an isocratic condition at H_2O:ACN:TFA (20:80:0.1) for 40-45 min. The purified fraction 35 is highlighted.

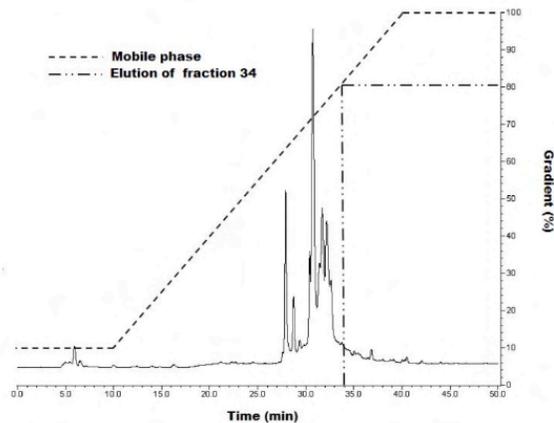



Fig.2 C18-Sephasil™ Peptide reversed-phase column chromatography. The inverse order for obtaining the sample is as follows: pool fractions C1 to C3 (P2) of C8-Supelco reversed-phase chromatography; pool of fractions 7 to 9 of molecular exclusion chromatography; pool of fractions 1 to 7 of ion exchange chromatography; intracellular extract of *S. sonnei* SS9 precipitated at 75% ammonium sulfate. The fractions were eluted with at a flow rate of 1.0 mL/min, with the following solvent conditions: H_2O:TFA (100:0.1) for 10 min, followed by a linear gradient to H_2O:ACN:TFA (20:80:0.1) during 30 minutes and an isocratic condition at H_2O:ACN:TFA (20:80:0.1) for 40-45 min. The purified fraction 34 is highlighted.

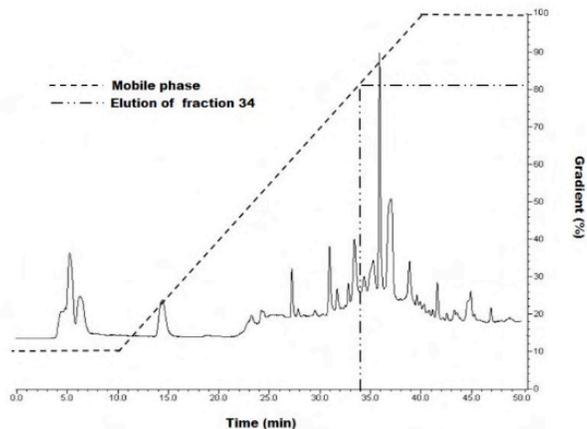



Fig. 3 C18-Sephasil™ Peptide reversed-phase column chromatography. The inverse order for obtaining the sample is as follows: pool fractions C4 to C10 (P3) of C8-Supelco reversed-phase chromatography; pool of fractions 7 to 9 of molecular exclusion chromatography; pool of fractions 1 to 7 of ion exchange chromatography; intracellular extract of *S. sonnei* SS9 precipitated at 75% ammonium sulfate]. C18-Sephasil™ The fractions were eluted with at a flow rate of 1.0 mL/min, with the following solvent conditions: H_2O:TFA (100:0.1) for 10 min, followed by a linear gradient to H_2O:ACN:TFA (20:80:0.1) during 30 minutes and an isocratic condition at H_2O:ACN:TFA (20:80:0.1) for 40-45 min. The purified fraction 34 is highlighted.

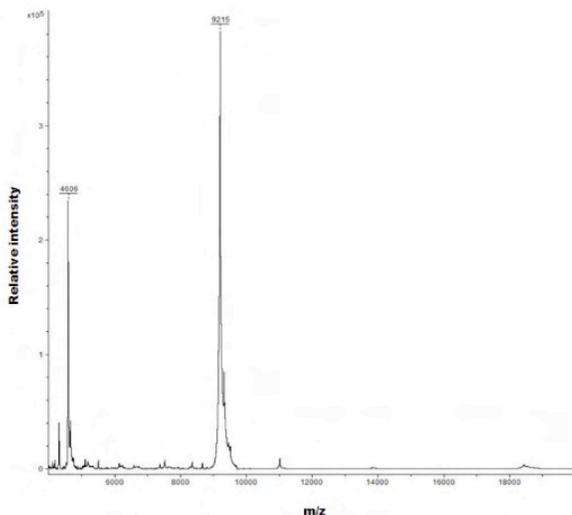



Fig. 4 MALDI mass spectrum of F1 sample, obtained in a Bruker Autoflex® equipment operated in the linear positive mode (Bruker Daltonics, Bilerica, MA). The inverse order for obtaining the sample is as follows: fraction 35 of C18-Sephasil™ Peptide reversed-phase chromatography; fraction B15 of C-8 Supelco reversed-phase chromatography; pool of fractions 2 to 6 of molecular exclusion chromatography; pool of fractions 1 to 7 of ion exchange chromatography.

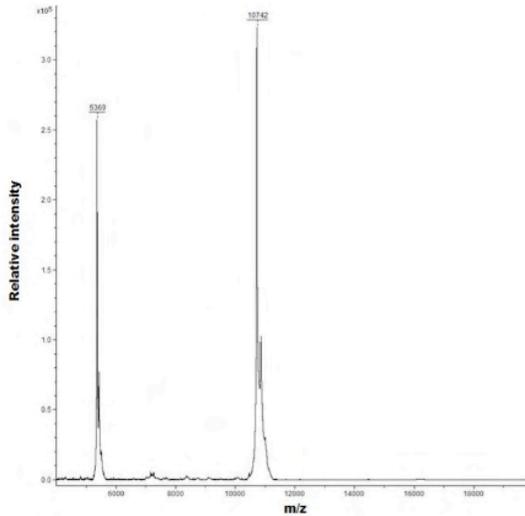



Fig. 5 MALDI mass spectrum of F2 sample, obtained in a Bruker Autoflex® equipment operated in the linear positive mode (Bruker Daltonics, Bilerica, MA). The inverse order for obtaining the sample is as follows: fraction 34 of C18-SephasilTM Peptide reversed-phase chromatography; pool fractions C1 to C3 of C-8 Supelco reversed-phase chromatography; pool of fractions 7 to 9 of molecular exclusion chromatography; pool of fractions 1 to 7of ion exchange chromatography.

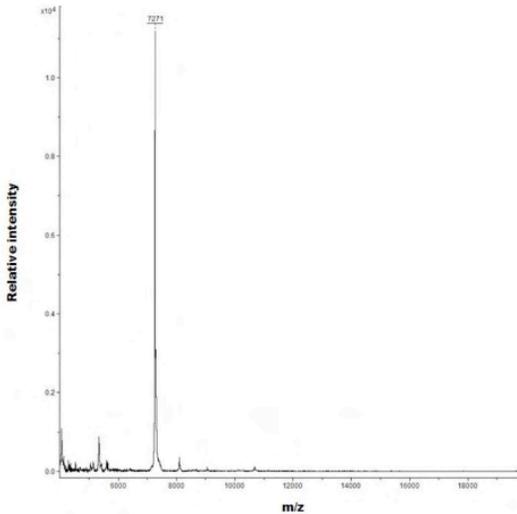



Fig. 6 MALDI mass spectrum of F3 sample, obtained in a Bruker Autoflex® equipment operated in the linear positive mode (Bruker Daltonics, Bilerica, MA). The inverse order for obtaining the sample is as follows: fraction 34 of C18-SephasilTM Peptide reversed-phase chromatography; pool fractions C4 to C10 of C-8 Supelco reversed-phase chromatography; pool of fractions 7 to 9 of molecular exclusion chromatography; pool of fractions 1 to 7 of ion exchange chromatography.

Sample	Volume (ml)	Titration of the antagonistic action (AU/ml)	Total activity (AU)[a]	Pr otein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (AU/mg)
C-75	23	3.6×10^{18}	8.3×10^{19}	113	2599	3.2×10^{16}
Pool of fractions 1 to 7 of Mono-Q™ ion exchange chromatography	8	1.4×10^{16}	1.1×10^{17}	24	192	5.7×10^{14}
Pool of fractions 2 to 6 of Superose 12 molecular exclusion chromatography	3	2.5×10^{4}	7.5×10^{4}	17	51	1.5×10^{3}
Pool of fractions 7 to 9 of Superose 12 molecular exclusion chromatography	1.8	800	1.4×10^{3}	0.9	1.6	8.7×10^{2}

[a]: arbitrary unit

Tab. 1 Volume, titration of the antagonistic action, total activity, protein, total protein, specific activity of the C-75 extract and the partially purified fractions produced by *Shigella sonnei* SS9

Mass spectrometry								
Sample	**Experimental molecular mass (Da)**	**Amino acid sequence identified**	**Identification of the molecule**	**Amino acids**	**Identity**	**Query coverage**	**Accession [a]**	**Predicted isoelectric point [b]**
F1	9,215	MNKSQL IDKIAAGA DISKAAA GRALDAII ASVTESLK EGDDVAL VGFGTFAV	DNA-binding protein HU-beta (*Shigella sonnei*)	90	100%	100%	WP_ 052978778	8.9
F2	10,742	LREFVTA KFAKLE QYFDRI	Ribosome hibernation promoting factor (*Shigella sonnei*)	95	100%	100%	WP_ 052983145.1	6.3
F3	7,271	SVEEL NTELNL NLRKEF	50S ribosomal protein L29 (*Escherichia coli*)	63	83%	100%	WP_ 023146509.1	9.5

[a]: The purified substances were identified by comparison with the deposited sequences on the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST- P) program. (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov)

b: The isoelectric point was determined using protein isoelectric point calculator website (http://isoelectric.org/calculate.php)

Tab. 2 Identification of molecular mass, partial amino acid sequence and predicted isoelectric point of the purified antagonist substances F1, F2 and F3 synthesized by *Shigella sonnei* with isoantagonist action

CAPÍTULO 3

SUSCETIBILIDADE IN VITRO DE *Pythium insidiosum* FRENTE AOS ÓLEOS DE *Helianthus annus* L., *Eugenia caryophyllata* E SUAS COMBINAÇÕES

Data de aceite: 28/09/2022

Caroline Quintana Braga
Universidade Federal de Pelotas
Pelotas- Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/3480021230833629

Júlia de Souza Silveira
Universidade Federal de Pelotas
Pelotas- Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/1459260532249554

Daniela Isabel Brayer Pereira
Universidade Federal de Pelotas
Pelotas- Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/3382450720179401

RESUMO: *Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático causador da pitiose, uma enfermidade infecciosa, não contagiosa, e de prognóstico desfavorável. Fármacos antifúngicos convencionais são pouco eficazes sobre esse micro-organismo, pois a maioria possui seu mecanismo de ação atuando sobre o ergosterol da membrana celular, que está ausente neste oomiceto. Apesar do avanço nas pesquisas, o tratamento da pitiose ainda não está completamente estabelecido. Diante desses fatos, a terapia utilizando óleos essenciais de plantas bioativas e suas associações surgem como novas alternativas no combate a esse patógeno. O presente estudo buscou avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente ao óleo de *Helianthus annus* L. ozonizado e a *Eugenia caryophyllata* individualmente e combinados entre si, frente a 30 e 20 isolados clínicos de *P. insidiosum*, respectivamente. O inóculo utilizado no teste de suscetibilidade foi preparado a partir de cultura micelial de *P. insidiosum*. Para a realização do teste de suscetibilidade empregou-se o método de microdiluição em caldo baseado no protocolo M-38A2 do CLSI e as combinações foram avaliadas pela técnica de *cherkerboard*. O óleo de *H. annus* L. e *E. caryophyllata* foram obtidos comercialmente e os componentes do óleo essencial foram previamente determinados pelo fabricante. As concentrações testadas variaram entre 56.000µg/mL a 0,05 µg/mL para ambos os óleos. A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). As concentrações acima da concentração inibitória mínima foram utilizadas para determinação da Concentração Oomicida Mínima (COM). A menor concentração do óleo que não evidenciou crescimento foi considerada a COM. Os resultados para os testes isoladamente demonstram que a CIM_{50} e CIM_{90} foram de 3500 *µ*g/mL e 28000 *µ*g/mL, respectivamente para *H. annus* L. e de 875 *µ*g/mL e 7000 *µ*g/mL, respectivamente para *E. caryophyllata*. A combinação de ambos os óleos evidenciou sinergismo em 95% (19/20) dos isolados avaliados e indiferença em 5% (1/20). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os óleos de *H. annus* L. e *E. caryophyllata* podem constituir-se numa terapia adicional ao tratamento da pitiose. No entanto, outras pesquisas são necessárias para verificar sua aplicabilidade em pitiose clínica.

PALAVRAS – CHAVE: Oomicetos, pitiose, *Helianthus annus* L., *Eugenia caryophyllata*.

INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum e pitiose

Pythium insidiosum é o agente causador da pitiose em mamíferos (GAASTRA et al., 2010). Trata-se de um oomiceto aquático classificado no Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero Pythium e Espécie *Pythium insidiosum* (ALEXOUPOLOS, 1996). Trata-se de uma doença de caráter invasivo de rápida progressão e difícil tratamento (HILTON et al., 2016). Possui distribuição mundial, ocorrendo em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (MENDOZA et al., 1996). No Brasil, a pitiose acomete principalmente equinos, com maior número de relatos na região Sul do país e Pantanal mato-grosense, e em humanos, com elevado número de infecções na Tailândia (LEAL et al., 2001; MARCOLONGO-PEREIRA, 2012; WEIBLEN et al., 2015; KRAJAEJUM et al., 2018; ROMERO et al., 2019).

Comumente, observam-se que os animais afetados, permanecem por longos períodos em contato com águas paradas em lagos, açudes ou banhados (CHAFIN et al., 1995). Em seu ciclo biológico, *P. insidiosum* utiliza plantas aquáticas para o seu desenvolvimento, fazendo reprodução assexuada que se caracteriza pela formação de zoósporos infectantes os quais são liberados na água e movimentam-se até encontrar outra planta para completar seu ciclo. Todavia, estes zoósporos também podem ser atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados, onde se fixam e emitem tubos germinativos dando início a infecção (MILLER, 1983). Não há predisposição por raça, idade ou sexo, nem há relatos da contaminação entre os animais e o homem. (MENDONZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTURIO et al., 2006). Dentre as espécies domésticas, os equinos são os mais suscetíveis e se infectam ao entrar em contato com áreas alagadas com presença de zoósporos de *P. insidiosum*. Nestes animais, a enfermidade caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões cutâneas ulcerativas, de evolução rápida, formando grandes massas teciduais de bordas irregulares e aparência tumoral. No interior das lesões observa-se abundante tecido conjuntivo fibroso de consistência firme e aspecto arenoso e ramificadas ‘’*kunkers*” que facilmente se desprendem da lesão (CHAFFIN et al.,1995; MENDOZA et al., 1996). Os ‘’*kunkers*” auxiliam no diagnóstico da doença, porém ao se desprenderem da lesão em ambientes favoráveis, refazem o ciclo biológico mantendo a contaminação do ambiente (FONSECA et al., 2014a). Já nas demais espécies, estas estruturas não são observadas e a doença se manifesta na forma de piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (MILLER et al., 1983; FOIL et al., 1984; GROOTERS, 2003). Em caninos, as lesões gastrointestinais são as mais comuns (GROOTERS, 2003), enquanto as formas cutâneas/subcutâneas com desenvolvimento de lesões ulcerativas são frequentes nas demais espécies, incluindo bovinos (PÉREZ et. al., 2005; GRECCO et al., 2009;), ovinos (TABOSA et al., 2004), ovinos e caprinos (DO CARMO et al., 2020), e felinos (SOARES et al., 2019; DOWST et al., 2019). Relatos em espécies silvestres também são descritas na literatura, incluindo

caso de pitiose em dromedário (WELLEHAN et al., 2004), onça-pintada (CAMUS et al., 2004), tigre de bengala (BUERGELT et al., 2006), caraúna (PESAVENTO et al., 2008), camelo (VIDELA et al., 2012) e avestruz (SOUTO et al., 2019) Em humanos a pitiose é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, sendo comum na Tailândia (KRAJAEJUM et al., 2006), manifestando-se nas formas cutânea, subcutânea, ocular, vascular e sistêmica (SALIPANTE et al., 2012; SCHLOEMER et al., 2013; KHUNKHET et al., 2015; LELIEVRE et al., 2015; SERMSATHANASAWADI et al., 2016; NEUFELD et al., 2018; CHITASOMBAT et al., 2018).

Tratamento

O tratamento de infecções causadas por *P. insidiosum* é complicado e desafiador. Por possuir uma via incompleta de biossíntese de esteróis, *P. insidiosum* necessita incorporar esteróis exógenos à sua membrana célula. Este fato justifica, em parte, a resistência de *P. insidiosum* e os insucessos nos tratamentos que utilizam antifúngicos, os quais têm ação sobre os esteróis de membrana (LERKSUTHIRAT et al., 2017). A busca por tratamentos efetivos contra a pitiose impulsionou o desenvolvimento de diversas pesquisas que visam à formulação de protocolos terapêuticos eficazes para combater a enfermidade. Nesse sentido, destacam-se as pesquisas com fármacos da classe dos antibacterianos (ITAQUI et al., 2016; JESUS et al., 2016; BAGGA et al., 2018; CHATTERJEE; AGRAWAL, 2018; LORETO et al., 2018, 2019), antifúngicos, tais como: caspofungina, micafungina, terbinafina (PEREIRA et al., 2007; ZANETTE et al., 2015; ITAQUI et al., 2016) óleos essenciais e compostos naturais (FONSECA et al., 2015a, ARAUJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; VALENTE, 2016a, b;), nanocompostos (VALENTE et al., 2016a); nanopartículas de prata (bio-AgNP) (VALENTE et al., 2018) e compostos metálicos (RIBEIRO et al., 2017).

Óleos essenciais

As plantas são utilizadas há milhares de anos na terapêutica. Suas partes como raiz, folhas e flores fornecem substâncias bioativas capazes de auxiliar na cura de doenças e na fabricação de medicamentos (ROSA et al., 2012). Essas substâncias se destacam pelas suas propriedades medicinais, que incluem ações antimicrobianas, analgésicas, anestésicas e anti-inflamatórias (BAKKALI, 2008). Os óleos essenciais são compostos aromáticos originários do metabolismo secundário das plantas. Suas propriedades terapêuticas despertaram um crescente interesse nos estudos relacionados à terapia antimicrobiana. Além disso, por se tratar de compostos naturais, os mesmos apresentam um alto potencial medicinal na busca por tratamentos com baixa toxicidade e menos agressivos FONSECA et al. (2015b). Estudos empregando compostos aromáticos e bioativos de plantas surgiram recentemente como uma nova linha de pesquisa na terapêutica da pitiose. Nesse sentido, investigações sobre a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum*, frente a óleos essenciais de *Origanum vulgare, Origanum majorana, Mentha piperita, Rosmarinus officinalis e Melaleuca alternifolia* demonstraram resultados promissores (FONSECA et al., 2015a ,b VALENTE

et al., 2016a,b). Da mesma forma, pesquisas vêm avaliando a ação antimicrobiana de compostos bioativos e óleos essenciais de plantas (JESUS et al., 2015; FONSECA et al., 2015a,b), bem como de compostos extraídos de raiz (SRIPHANA et al., 2013ab) e de frutos de plantas (SUTHIWONG et al. 2014).

O óleo essencial de cravo (*Eugenia cariophollata*) é uma especiaria usada há muitos anos na culinária, perfumaria e também apresenta propriedade antibactericida. Quando testada contra bactérias com *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Campylobacter jejuni, Salmonella Thyphimurium, Pseudomonas aeruginosa e Clostridium perfringens.*a ação do óleo diminuiu significativamente a taxa de crescimento destes micro-organismos (SCHERER et al., 2009). Esse óleo tem como princípio ativo o eugenol, um composto fenólico (4-alil-2-metoxifenol-C10H12O2), que está presente no caule, flores e folhas da planta (GRIFFITHS, 2000). O eugenol possui atividade antibactericida contra *Streptococus mutans, Bacillus cereus e antifúngica conta Aspergillus niger, Candida albicans*, entre outras espécies de fungos, além de possuir efeito anti-inflamatório, cicatrizante e analgésico (DELESPAUL et al., 2000).

O óleo vegetal de girassol (*Helianthus annus* L.) por sua vez, tem aplicações em diversas finalidades como na indústria cosmética, farmacêutica, alimentícia, veterinária, dentre outras. Este óleo tem como principais componentes majoritários os ácidos linoleicos e oleicos. Os óleos podem ser utilizados na sua forma pura ou ozonizados. A utilização do ozônio no tratamento de diversas enfermidades é conhecida como ozonoterapia. O ozônio apresenta benefícios quando utilizado como agente terapêutico devido ao fato de ser um potente oxidante, participando ativamente do processo de cicatrização devido às suas propriedades antimicrobianas. Quando associado com óleos apresenta diversas características biológicas importantes como a ação bactericida, inativação de fungos e vírus, proliferação celular e tecidual (BOCCI et al., 1994). Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa constatou que o óleo de girassol ozonizado foi capaz de inibir completamente o crescimento de *P. insidiosum in vitro* e *ex vivo* (ZAMBRANO et al., 2019).

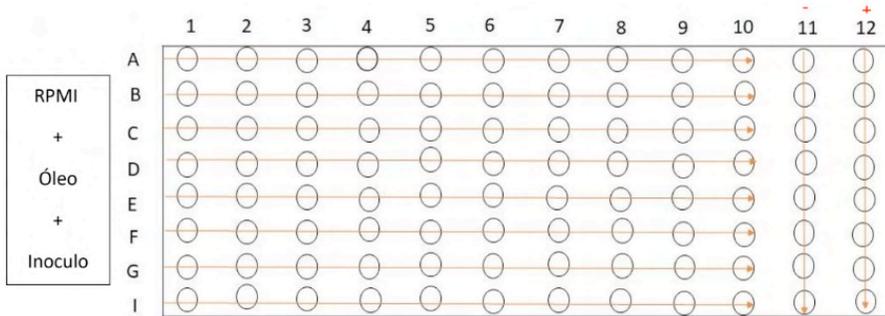
Considerando-se as dificuldades encontradas na cura da pitiose, a necessidade de alternativas terapêuticas e o potencial antimicrobiano dos óleos extraídos de plantas, elaborou-se o presente estudo que busca avaliar a suscetibilidade in vitro de *P. insidiosum* frente a óleo de *Helianthus annus* L. ozonizado (óleo de girassol) e à *Eugenia caryophyllata* (óleo de cravo), individualmente e combinados entre si.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *P. insidiosum*: Foram utilizados 30 isolados de *P. insidiosum*, oriundos de 27 equinos e 2 caninos naturalmente infectados e uma cepa padrão (CBS 101555). Todos os isolados pertencem à micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas e foram identificados por características macro e micro morfológicos e

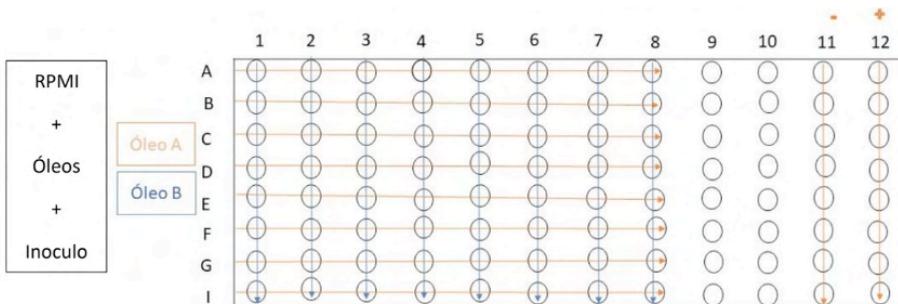
confirmados molecularmente conforme descrito por AZEVEDO et al. (2012).

Preparo dos inóculos: Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados utilizando como inóculo o micélio de *P. insidiosum*, preparado conforme previamente descrito por Fonseca et al. (2014b). O inóculo foi preparado a partir do cultivo de duas placas de Petri contendo agar levedura 0,1%, incubadas durante quatro dias em estufa a 37ºC. Sobre estas culturas foi dispensado um volume de 10mL de água destilada estéril e o micélio foi raspado com auxílio de lâmina de bisturi esterilizada. Essa solução foi transferida para um tubo de ensaio e o inóculo obtido foi então ajustado em espectrofotômetro a uma transmitância de 80 a 85%. Logo após foi diluído 1:10 em caldo RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M MOPS.

Testes isolados de suscetibilidade *in vitro*: Os testes de suscetibilidade foram realizados seguindo o protocolo de microdiluição em caldo (M38-A2) do CLSI. O óleo de girassol (*Helianthus annus* L.) ozonizado (OGO) foi obtido comercialmente pelo fabricante Ozone & Life. A composição do óleo foi fornecida pelo fabricante, sendo seus componentes majoritários: ácido linoleico (65%), ácido oleico (20%), ácido palmítico (5%) e ácido esteárico (5%). O Óleo Essencial de Cravo Folha (OEC) (*Eugenia caryophyllata)* foi obtido comercialmente da empresa Ferquima. Os principais componentes descritos pelo fabricante correspondem ao Eugenol=86% Beta-cariofileno= 10% Acetato Eugenila= 1%. A solução-estoque dos óleos foi preparada adicionando-se 450.000 μg do óleo essencial em 8.000μl de RPMI e 50μl de Tween 80 obtendo a concentração de 56.000µg/mL. A partir das soluções-estoque, foram preparadas dez diluições sucessivas em meio RPMI 1640, as quais variaram de 56.000 a 0,05 µg/mL para ambos os óleos. Alíquotas de 100μL dessas diluições foram dispensadas sequencialmente nas microplacas, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. A estas colunas foi distribuído um volume de 100μL do inóculo. Para cada teste foram utilizadas colunas controle positivo (inóculo+RPMI) e negativo (óleo+RPMI). As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação constante a 40 rpm, durante 48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata. A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração em que não houve o crescimento de hifas. As concentrações acima da concentração inibitória mínima foram utilizadas para determinação da concentração oomicida mínima (COM). Para isto, 100 µL da diluição foram transferidos para tubos contendo 900 µL de caldo Sabouraud, ficando incubados a 370C por 24 horas. A menor concentração do óleo que não evidenciou crescimento foi considerada a COM.

Controle - = RPMI + ÓLEO

Controle + = RPMI + INOCULO

Figura 1: Montagem da placa do teste de suscetibilidade simples.

Testes associados *in vitro:* A associação de (OGO) ao (OEC) foi realizada frente a 20 isolados de *P. insidiosum*. Os óleos foram testados nas concentrações de 14.000 a 55 µg/mL e os testes foram realizados empregando a técnica de *cherkerboard* para microdiluição (NCCLS, 2008). Foram utilizados 50µL de RPMI 1640, 50µL do óleo de (OGO) e 50µL do (OEC) em cada diluição, adicionado de 100µL do inóculo. FIGURA 2. A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a concentração inibitória mínima (MIC). A interação foi classificada como sinérgica (Fração de Concentração Inibitória - [FICI] ≤ 0,5), indiferente (0,5 < FICI ≥ 4) ou antagonista (FICI > 4), utilizando a seguinte fórmula: FICI = (MIC A na combinação/ MIC A) + (MIC B na combinação/ MIC B). (JOHNSON, 2004)

Controle - = RPMI + ÓLEO

Controle + = RPMI + INOCULO

Figura 2: Montagem da placa do teste de suscetibilidade da técnica de *cherkerboard*.

RESULTADOS

ÓLEOS	CIM $_{50}$[1] µg/Ml	CIM $_{90}$[2] µg/mL	Variação da CIM[3] µg/mL
(*Helianthus annus* L.) ozonizado	3500	28000	875-28000
Eugenia caryophyllata	875	7000	109,37-28000

[1] Concentração inibitória mínima que inibiu 50% dos isolados; [2]Concentração inibitória mínima que inibiu 90% dos isolados; [3] Variação da concentração inibitória mínima;

Tabela 1: A suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* aos óleos individuais de *Helianthus annus* L. ozonizado (OGO) e *Eugenia caryophyllata*(OEC)

Evidenciou-se que os óleos de (OGO) e (OEC) apresentaram atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*. Observou-se que (OEC) demonstrou melhor atividade antimicrobiana apresentando MIC_{50} em 875 μg/mL e MIC_{90} em 7000 μg/mL. As concentrações fungicidas mínimas (CFM) dos óleos testados foram iguais as CIM para todos os isolados do oomiceto. A suscetibilidade in vitro de *P. insidiosum* frente às combinações dos óleos de (OGO) e (OEC) está demonstrada na Tabela 2. A combinação de ambos os óleos evidenciaram sinergismo em 95% (19/20) dos isolados do oomiceto e indiferença em 5% (1/20). Antagonismo não foi observado nesta combinação. Adicionalmente, evidenciou-se que a CIM nas combinações apresentou menores valores que a CIM isolada. Esses valores para (OGO) diminuíram de 28000 μg/mL para 109,37 μg/mL em alguns isolados. Para (OEC), diminuiu de 7000 μg/mL para 109,37 μg/mL na maioria dos isolados testados.

Isolados	[1]CIM da combinação (µg/mL)		
	OGO/OEC	[2]FICI	[3]In
008	109,37/875	0,2	S[4]
009	437,5/109,37	0,1	S
013	218,75/109,37	0,5	S
014	437,5/109,37	0,4	S
015	875/ 109,37	0,1	S
016	437,5/109,37	0,1	S
019	437,5/109,37	0,3	S
021	218,75/109,37	0,4	S
023	437,5/109,37	0,1	S
026	437,5/109,37	0,2	S
0,27	437,5/109,37	0,05	S

0,29	437,5/109,37	0,3	S
030	218,75/109,37	0,2	S
032	218,75/109,37	0,04	S
035	218,75/109,37	0,2	S
036	218,75/109,37	0,09	S
038	109,37/218,75	0,2	S
040	218,75/109,37	0,3	S
041	437,5/109,37	0,5	S
CBS 101555	437,5/109,37	0,7	I[5]

[1]CIM, concentração inibitória mínima;[2] FICI, índice de concentração inibitória fracional; [3] In interpretação; [4] S, sinergismo; [5] I, indiferença.

Tabela2: Perfil de suscetibilidade in vitro de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente às combinações dos óleos de *Helianthus annus* L. (OGO) *Eugenia caryophyllata* (OEC)

DISCUSSÃO

A busca por terapias e combinações de protocolos terapêuticos vem aumentando nos últimos anos devido às falhas no tratamento da pitiose. Os insucessos no tratamento da doença devem-se, em parte, às peculiaridades do micro-organismo, especialmente a ausência de ergosterol na membrana plasmática, componente alvo de ação da maioria das terapias antifúngicas disponíveis (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). A busca por uma terapêutica eficaz para pitiose é de extrema importância e a fitoterapia tem sido o foco de diversos estudos científicos devido às propriedades antioxidantes e antimicrobianas das plantas medicinais. O emprego de óleos essenciais em terapias antimicrobianas pode ser considerado um método vantajoso, pois possui menor impacto ambiental e baixa toxidade às células dos mamíferos (Fonseca et al., 2014b).

Diversos óleos essenciais de plantas medicinais foram avaliados sobre isolados de *P. insidiosum* com resultados satisfatórios (FONSECA et al., 2015a, b; VALENTE et al., 2016a, b). No tratamento da pitiose experimental em formulação de uma base de gel não ionizável, a utilização de *M. piperita* e *Origanum vulgare* apresentou resultados bastante promissores, mostrando ser uma alternativa propícia a ser associada ao tratamento da enfermidade (FONSECA et al., 2015b).

Pesquisas empregando óleos essenciais ou compostos bioativos se fazem necessárias, uma vez que é crescente o número de cepas de micro-organismos resistentes aos fármacos antimicrobianos (DORMAN; DEANS et al., 2000). Nos últimos anos, pesquisas *in vitro* e *in vivo* avaliando a suscetibilidade de *P. insidiosum* aos óleos essenciais (Fonseca et al., 2015a,b ; VALENTE et al., 2016a,b), surgiram como uma nova proposta de terapia para a pitiose. O presente estudo avaliou a suscetibilidade in vitro de *P. insidiosum* frente aos óleos de *H. annus* L. ozonizado (óleo de girassol) e *E. caryophyllata* (óleo de cravo) isolados e em combinação. Os resultados evidenciaram que os óleos avaliados

apresentaram atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*, corroborando com Fonseca et al. (2015b) que relataram a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* aos óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare*. Adicionalmente, estudos de Valente et al. (2016b) demonstraram a atividade anti-*Pyhtium* de plantas medicinais *Melaleuca alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* com CIM próximas às encontradas neste estudo. Estudos de Zambrano et al. (2019) evidenciaram a atividade in vitro anti-*P. insidiosum* do (OGO), bem como demonstraram que o crescimento do oomiceto foi inibido após a exposição de material clínico (*kunkers*) ao óleo ozonizado. Os autores concluíram que o (OGO) apresenta importante atividade anti-*P. insidiosum*, o qual pode vir a ser um potente aliado da medicina integrativa a ser empregado na terapia da pitiose em animais.

Adicionalmente, o óleo de *H. annus* L. é muito utilizado como cicatrizante (MARQUES et al. 2004). Contudo, de acordo com as propriedades do óleo de girassol ozonizado e de seus compostos e considerando os resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que ele pode contribuir no processo de redução das lesões cutâneas de pitiose. A atividade antimicrobiana de *E. caryophyllata* tem sido amplamente estudada contra diferentes micro-organismos, entre eles: bactérias (SABAHAT e PERWEEN, 2008) fungos (PINTO et al., 2009) e parasitos (YANG et al., 2003). O principal componente desse óleo é o eugenol, um composto fenólico volátil presente nas folhas e botões florais da planta que representa 95% do óleo extraído das folhas. O eugenol junto como acetato de eugenila e o β-cariofileno representam 99% do óleo essencial (RAINA, 2001). Segundo Delespaul et al. (2000), este componente possui atividade antimicrobiana e antifúngica. Os óleos essenciais possuem efeitos antimicrobianos que podem ser atribuídos ao seu mecanismo de ação atuando geralmente sobre a membrana citoplasmática. Estes mecanismos envolvem a lise e a perda da integridade da membrana devido às alterações que determinam a saída de íons (hidrogênio, potássio e cálcio), gerando danos aos processos essenciais à sobrevivência da célula (DORMAN; DEANS, 2000; RAO et al., 2010). A combinação entre os óleos de *H. annus* L. ozonizado e *E. caryophyllata* evidenciaram sinergismo em 95% (19/20) dos isolados de *P. insidiosum* testados. Estes resultados foram similares aos relatados por Valente et al. (2016a) que demonstraram 65% de sinergismo na combinação dos óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare*. Adicionalmente, Fonseca et al. (2015b) ao avaliar a combinação de *M. piperita* e *O. vulgare* na pitiose experimental associada ou não a outras terapias, sugeriram que o emprego de óleos essenciais em combinação entre si e/ou em associação com outros fármacos antimicrobianos ou imunoterapia pode se constituir numa alternativa viável de tratamento da pitiose cutânea em animais. Em outro estudo, Valente et al. (2016b) ao investigar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* nas combinações entre os óleos de *M. alternifolia, M. piperita* e *O. vulgare* associados ao itraconazol evidenciaram efeitos sinérgicos na associação, sugerindo assim que a combinação entre plantas bioativas e fármacos antifúngicos podem constituir uma alternativa terapêutica a ser aplicada no controle de infecções causadas por *P. insidiosum*. Os resultados do

presente estudo permitem inferir que as CIM dos óleos de *H. annus* L. e E. *caryophyllata* diminuíram quando combinados, podendo ser empregados em associação no combate a *P. insidiosum*. Segundo Zhu et al. (2004) a combinação de dois compostos pode elevar a taxa de morte microbiana e diminuir a duração do tratamento, permitindo o uso de doses mais baixas de cada composto, reduzindo os efeitos tóxicos dos mesmos. Os resultados obtidos somam-se aos estudos prévios que avaliaram a atividade anti-*Pythium* de óleos essenciais de plantas. Sugere-se que o emprego dos óleos de girassol e cravo, isolados ou em combinação, podem ser uma alternativa viável de tratamento da pitiose cutânea em animais. No entanto, outras pesquisas são imprescindíveis para determinar novos protocolos terapêuticos envolvendo o emprego de tais óleos.

CONCLUSÕES

P. insidiosum apresenta suscetibilidade in vitro aos óleos de *H. annus* L. ozonizado e *E. caryophyllata* bem como as suas combinações. Evidencia-se melhor atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. caryophyllata* quando avaliado isoladamente. O acentuado efeito sinérgico das combinações dos óleos de *H. annus* L. ozonizado e *E. caryophyllata* sugerem que esta combinação deve ser considerada como uma terapia aditiva e/ou alternativa para o tratamento da pitiose.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 683- 737.

ARAUJO, M.J.A.M.; BOSCO, S.M.G.; SFORCIN, J.M. *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis pn hyfal growth. Brazilian **Journal of Microbiology**, v.47, n.4, p.863-869, 2016.

AZEVEDO, M.I,*et al* . *Pythium insidiosum*: morphological and molecular identification of Brazilian isolates. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.32, p.619-22, 2012.

BAGGA, B. *et al*. Leap forward in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis. British **Journal of Ophthalmolog**, v.102, n.12, p. 1629-1633, 2018.

BAKKALI, F. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology,** v.46, n.2, p.446–475, 2008.

BOCCI, V. *et al*. Studies on the biological effects of ozone Production of transforming growth factor by human blood after ozone treatment. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, v.8, p108-112, 1994.

BUERGELT, C. *et al.* Abdominal pythiosis in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n.2, p.186–189, 2006.

CAMUS, A.C.; GROOTERS, A.M.; AQUILAR, R.F. Gramulomatus pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar. Panthera onca. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p. 567-571, 2004.

CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.C. Cutaneous pythiosis in the horse. Veterinary Clinics of North America: **Equine Practice**, v. 11, n. 1, p. 91-103, 1995.

CHATTERJEE, S.; AGRAWAL, D. Azitromycin in the management of *Pythium insidiosum* keratitis. **Cornea**, v.37, n.2, p. e8-e9, 2018.

CHITASOMBAT, M. N *et al.* Clinicopathological feature and outcomes of pythiosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v.71, p.99-41, 2018.

DELESPAUL, Q. *et al*. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Jounal of Essential Oil Research**, v. 12, n.2, p. 256-266, 2000.

DO CARMO, P.M.S; UZAL, F. A.; CORREA, F.R; Diseases caused by *Pythium insidiosum* in sheep and goats: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n.1, p. 20–24, 2020.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Aplicaded Microbiology**, v.88, n.22, p.308-316, 2000.

DOWST, M. *et al*. An unusual case of cutaneous feline pythiosis. **Medical Mycology Case Repots**, v.26, p.57-60, 2019.

FOIL, C.S.O. Update on Pythiosis (Oomycosis). The North American Veterinary Conference. p. 57-63, 1996.

FONSECA A.O.S. *et al.* In vitro reproduction of the life cyle of *Pythium insidiosum* from kunkers' equine and their role in the epidemiology of pythoisis. **Mycopathologia,** v. 177, n.1-2, p.123-127, 2014a.

FONSECA, A.O.S. *et al. In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, n.6, p.1564-1567, 2014b.

FONSECA A.O.S. *et al. In vitro* susceptibility of Brazilian *Pyhtium insidiosum* isolates to essential oils of some Lamiaceae family species. **Micopathologia**, v.179, n.3-4, p.253-258, 2015a.

FONSECA, A.O. S. *et al.* Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Veterinary Microbiology**, v.178, n.3-4, p.265-269, 2015b.

GRECCO, F.B. *et al.* Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.11, 938-942, nov. 2009.

GRIFFITHS, S.P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **J. Fish Biol, London**, v. 57, p. 1453-1464, 2000.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomicosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, p. 695-720, 2003.

HILTON, R.E. *et al.* Swamp cancer: a case of human pythiosis and review of the literature. British **Journal of Dermatology**, v.175, p. 394-397, 2016.

ITAQUI, S.R. *et al*. *In vitro* synergim between azithromycin or terbinafine and tropical antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.8, p. 5023-5025, 2016.

JESUS F.P. *et al. In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.25, n.2, p. 89-93, 2015.

JESUS, F.P. *et al. In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin, or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.1, p.87-91, 2016.

JOHNSON, M. D. *et al.* Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.3, p.693-715, 2004.

KRAJAEJUN, T. *et al*. Assessment of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification and biotyping of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **International Journal of Infectious Diseases**, v.77, p.61-67, 2018.

KHUNKHET, S. RATTANAKAEMAKORN, P. RAJATANAVIN, N. Pythiusis presenting with digital gangrene and subcutaneous nodules mimicking medium vessel vasculitis. **JAAS Case Reports**, v.1, n. 6, p. 399-402, 2015.

LEAL, A.B.M. *et al*. Pitiose eqüina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.4, p.151-156, 2001.

LELIEVRE, L. *et al.* Imported *Pyhtium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler. **Americam Journal of Medicine and Hygiene**, v.92, n. 2, p. 2170-173, 2015.

LERKSUTHIRAT, T. *et al*. Evolution of the Sterol Biosynthetic Pathaway of the Sterol Biosynthetic Pathaway of *Pythium insidiosum* and Related Oomycetes Contributes to Antifungal Drug Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemother**, n. 4, p 1-37, 2017.

LORETO, E.S. *et al. In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, n.3, p.1678- 1717, 2018.

LORETO, E.S. *et al*. Efficacy of miltefosine therapy against subcutaneous experimental pythiosis in rabbits. **Journal de Mycologie Médicale**, v.30, n.1, p.1009-1019, 2019.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. *et al*. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.865-868, 24 2012.

MARQUES, S.R. *et al.* The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta. Cir. Bras**, v.19, n.3, p.196-209, 2004.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médical**, v. 6, n. 4, p. 151- 164, apr.1996.

MILLER, R. I. Investigations into the biology os three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopatologia**. v.81, p. 23-28, 1983.

NEUFELD, A*. et al*. *Pythium insidiosum* keratitis: a pictorial essay of natural history. Canadian Journal of Ophthalmology, v.53, n.2, p. 48-50, 2018.

PEREIRA, D.I.B.*et al.* Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals**. Journal of Antimicrobian and Chemother**, v.60, p.1168–1171, 2007.

PÉREZ, R.C. *et al.* Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. (1-2), p. 121-128, 2005.

PESAVENTO, P. A. *et. al*. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. **Veterinary Pathology**, v.45, n.4, p. 538-541, 2008.

PINTO, E. *et al*. Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on *Candida, Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1454-1462, 2009.

RAINA, V.K. *et al*. Essential oil composition of Syzygium aromaticum leaf from Little Andaman, India. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 5, p. 334-336, 2001.

RAO, A. *et al.* Mechanism of antifungal activity of terpenid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobian of Agents and Chemother**, v. 5, p.5062-5069, 2010.

RIBEIRO, T.C. *et al*. *In vitro* susceptibility of the oomycete *Pythium insidiosum* to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese or zinc. **Medical Mycology**, v.55, p.669-672, 2017.

ROMERO, A. *et al*. Equine pythiosis in the eastern wetlands of Uruguay. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.39, n.7, p.469-475, 2019.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Rev. bras. plantas medicinais**. v.14, n.2, p. 306-310, 2012.

SABAHAT, S., PERWEEN T. *In Vitro* Antibacterial Activity Of Clove Against Gram Negative Bacteria. Pakistan **Jourrnal of Botany**.v.40, n.5, p.2157-2160, 2008.

SALIPANTE, S. J. *et al.* Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection using PCR screening and DNA sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**. v.50, n. 4, p. 1480-1483, 2012.

SANTURIO, J.M. *et al.* Pitiose: uma micose emergente. Acta Scientiae Veterinariae, v.34, p.1-14, 2006.

SCHERER, R. *et al*. Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SCHLOEMER, N. J. *et al*. Fatal disseminated *Pythium insidiosum* infection in a child with diamond-Blackfan anemia. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v.21 n.4, p.24-26, 2013.

SERMSATHANASAWADI, N*. et al.* Outcomes and factors influencing prognosis in patients with vascular pythiosis. **Journal of Vascular Surgery**, v.64, n.2, p.411-417, 2016.

SOARES, L.M.C*. et al*. Feline subcuaneous pythiosis. **Ciência Rural**. v. 49, n.03, 2019.

SOUTO, E.P.F. *et al.* Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio camelus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.71, n.3, p.1081-1084, 2019.

SRIPHANA U. *et al.* New ligman esters from Alyxia schlechteri and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Fitoterapia.** v.91, p. 39-43, dec. 2013a.

SPRIPHANA, U. *et al.* Clauralia e from the roots of Clausena harmandiana and antifungal activity againt *Pythium insidiosum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p.1078-1083, 2013 b.

SUTHIWONG J. *et al.* Coumarinoid from the fruits of Micromelum facatum. **Fitoterapia**. v.94, p.134-141, apr. 2014.

TABOSA, I.M. *et al.* Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. **Veterinary Pathology**. v. 41, p. 412-415, jul. 2004.

VALENTE J.S.S. *et al. In Vitro* Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in Its Free Oil and Nanoemulsion Formulations Against *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v.181, n. 11-12, p.865-869, 2016a.

VALENTE J.S.S. *et al. In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia, Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. **Mycopathologia**, v.181, n.5-6, 2016b.

VALENTE J.S.S. *et al. In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v.57, n.7, p.858–863, 2018.

VIDELA, R. *et al*. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*), **Medical Mycology**, v. 50, n.2, p. 219-24, 2011.

WEIBLEN, C. *et al*. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil, **Ciência Rural**, v.46, n.1, p.126-131, 2016.

WELLEHAN, J.F.X. *et al*. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*), **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, p. 564-568, 2004.

YANG, B.H*. et al.* Activation of vanilloid receptor 1(VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v.82, p.781-785, 2003.

ZAMBRANO, C.G. *et al.* Óleo de girassol ozonizado: atividade anti-*Pythium insidiosum*, **Revista Brasileira de Medicina equina**, v. 13, n. 84, p. 18-20, 2019.

ZANETTE, R.A. *et al.* Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*, **Journal de Mycologie Médicale**, v.25, n.1, p. 91-94, 2015.

ZHU L.; GIL-LAMAIGNERE C.; MÜLLER F.C. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China, **Mycoses**.v.47, n.7, p.319-25, 2004.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DO TESTE SUPLEMENTAR GEENIUS HCV SUPPLEMENTAL ASSAY NA DISPARIDADE ENTRE RESULTADO DE TRIAGEM SOROLÓGICO-MOLECULAR PARA O VÍRUS DA HEPATITE C

Data de aceite: 28/09/2022
Data de submissão: 08/09/2022

Giovanna Ferreira da Silva
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará
Belém – Pará
lattes.cnpq.br/0808346629371478

Irley Karoline Seixas Paiva
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará
Belém – Pará
lattes.cnpq.br/9607218324011569

Mércia Ferreira Ribeiro
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará
Belém – Pará
lattes.cnpq.br/2658375749078326

Marcello do Couto Dias
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará
Belém – Pará
lattes.cnpq.br/0424501342776111

Katarine Antônia dos Santos Barile
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará
Belém – Pará
lattes.cnpq.br/9796290905591403

Carlos Eduardo de Melo Amaral
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará
Belém – Pará
lattes.cnpq.br/2763318798313735

RESUMO: A detecção de HCV na triagem, em doadores de sangue da Fundação Hemopa, é realizada simultaneamente por um teste sorológico e um teste molecular. Na discordância de resultados, é utilizado um teste confirmatório. *Geenius™ HCV Supplemental Assay* é utilizado como teste confirmatório suplementar de imunocromatografia para análise da presença de anticorpos específicos para HCV.**OBJETIVO:** Determinar a freqüência de resultado de imunocromatografia em amostras anti-HCV reagentes (positivos e inconclusivos) e teste de ácido nucléico (NAT) para HCV indetectáveis. **METODOLOGIA:** Foram avaliadas 55 amostras entre o período de Setembro de 2021 a Março de 2022. Todas as amostras selecionadas apresentaram sorologia anti HCV reagente e NAT indetectável. Foram utilizados, para detecção de anticorpos anti-HCV, o ensaio *Eclesys® Anti-HCV* com metodologia de eletroquimioluminescência, e para detecção de material genético de HCV, o Kit *NAT HIV/HCV/HBVBio-Manguinhos* com metodologia de PCR em tempo real. **RESULTADOS:** Conforme o ensaio sorológico *Eclesys® Anti-HCV*, de 55 amostras, 32,8% (17/55) apresentaram resultado de sorologia inconclusivo e67,2% (37/55) apresentaram resultado de sorologia positivo. Entre as amostras que tiveram resultado de sorologia inconclusiva, 100% (17/17) apresentaram resultados de imunocromatografia negativos**.** Entre as amostras que tiveram sorologia positiva, 97,2% (36/37) apresentaram resultados de imunocromatografia negativos e 2,8% (1/37) apresentaram resultados de imunocromatografia indeterminados. Não houve resultados positivos.

CONCLUSÃO: A imunocromatografia mostrou-se ferramenta eficiente para confirmar a não exposição ao HCV em 98% (54/55) dos doadores de sangue com resultados discordantes do teste de triagem sorológico-molecular para o HCV, permitindo que os doadores recebessem a devida orientação.
PALAVRAS CHAVE: HCV; IMUNOCROMATOGRAFIA; TESTE.

EVALUATION OF THE GEENIUS HCV SUPPLEMENTAL ASSAY SUPPLEMENTARY TEST ON THE DISPARITY BETWEEN MOLECULAR SEROLOGICAL SCRENING RESULTS FOR HEPATITIS C VIRUS

ABSTRACT: The detection of HCV in the screening of blood donors from Hemopa foundation is performed simultaneously by a serological and molecular test. In case of result discordance, a confirmatory test is used. The *Geenius™ HCV Supplemental Assay* is used as a supplementary confirmatory immunochromatographic test to analyse the presence of HCV-specific antibodies. **OBJECTIVE:** To determine the frequency of reagent anti-HCV immunochromatographic results (positive and inconclusive) and nucleic acid test (NAT) for undetectable HCV. **METHODOLOGY:** 55 samples were evaluated between September 2021 to March 2022. All selected samples showed reagent anti-HCV serology and undetectable NAT. For the detection of anti-HCV antibodies, the *Eclesys® Anti-HCV* assay with electrochemiluminescence methodology was used, and for the detection of HCV genetic material, the *NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos* kit with real-time PCR methodology was used. **RESULTS:** According to the *Eclesys® Anti-HCV* serological assay, of 55 samples, 32,8% (17/55) had an inconclusive serology result and 67,2% (37/55) had a positive serology result. Among the samples that had inconclusive results, 100% (17/17) presented negative immunochromatography results**.** Among the samples that had positive serology 97,2% (36/37) presented negative immunochromatography results and 2,8% (1/37) had indeterminate immunochromatography results. There weren't positive results. **CONCLUSION:** The Immunochromatography proved to be an efficient tool to confirm non-exposure to HCV, in 98% (54/55) of blood donors with discordant results in serological-molecular HCV screening tests, allowing donors to receive proper guiding.
KEYWORDS: HCV; IMMUNOCHROMATOGRAPHY; ASSAY.

1 | INTRODUÇÃO

A hepatite C é causada pelo HCV (Hepatitis C Virus), vírus de RNA pertencente ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviviridae.* A cronificação nas infecções causadas pelo HCV pode ser responsável pelo desenvolvimento de cirrose, descompensação hepática e carcinoma hepatocelular [4]. De acordo com o Ministério da Saúde, entre 1999 e 2018 foram notificados 359.673 novos casos de infeccção no Brasil. A transmissão do agente etiológico causador da hepatite C ocorre, principalmente, por via parenteral. Nesse âmbito, a testagem de bolsas de sangue nos hemocentros, antes da doação das mesmas, faz-se imprescindível [1].

No Hemocentro do Estado do Pará (Fundação Hemopa), a detecção de infeccção por

HCV em doadores de sangue é realizada simultaneamente a partir de triagem sorológico-molecular, utilizando-se o ensaio imunológico *Elecsys* ® *AntiHCV*, com metodologia de eletroquimioluminescência e o ensaio molecular *NAT HIV/HCV/HBV Bio- Manguinhos* com metodologia de PCR em tempo real.

O kit utilizado *NAT HIV/HCV/HBV Bio- Manguinhos* possui o princípio de detecção de ácidos nucléicos por meio da técnica de PCR em tempo real. A detecção de ácidos nucléicos virais precede o período de detecção de anticorpos, durante a fase inicial da infecção, conhecida por janela imunológica. Com a utilização do ensaio mencionado, o período de detecção diminui para 10 ou 12 dias, fator que contribui para a segurança transfusional[3]. A utilização do NAT em conjunto com o ensaio *Elecsys* ® *AntiHCV,* no entanto, apresentaram discordâncias em seus resultados em amostras anti-HCV reagentes de doadores da Fundação Hemopa, fazendo-se necessária a realização de teste complementar imunocromatográfico para confirmação da não exposição ao HCV.

Geenius™ *HCV Supplemental Assay* é um teste imunocromatográfico qualitativo utilizado para confirmar a presença de anticorpos anti-HCV em amostra de sangue total, soro ou plasma. A utilização do teste em questão é justificada pela discordância entre os testes realizados na etapa de triagem. Destina-se, dessa forma, a ser utilizado como teste adicional na etapa confirmatória de não exposição ao Vírus da hepatite C. [2] Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar a freqüência de resultados de imunocromatografia, bem como avaliar o desempenho do ensaio complementar *Geenius*™ *HCV Supplemental Assay* em amostras reagentes e NAT indetectáveis no Hemocentro do Estado do Pará no período de setembro de 2021 a março de 2022.

2 I MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação do teste foi realizada no laboratório de Biologia Celular e Molecular da Fundação HEMOPA (GEBIM). Para tal, foi utilizado o kit *Geenius*™ *HCV SupplementalAssay*, com metodologia de imunocromatografia e finalidade de detecção de anti corpos anti-HCV em amostras de soro, sangue total ou plasma.A realização do teste imunocromatográficose dá de acordo com a utilização da proteína A de ligação ao anticorpo, conjugada com partículas coloridas de celulose e os antígenos específicos (NS3, NS4, NS5 e capsídeo) ligados à membrana da fita. Como resultado, pode haver a captura dos anticorpos anti-HCV, produzindo uma reação colorimétrica na área teste do cassete e na área de controle da reação. Para leitura do teste realizado, é necessário Sistema Geenius com software específico. Para o ensaio sorológico de triagem utilizou-se o kit *Elecsys* ® *AntiHCV*, com metodologia de eletroquimioluminescência. Para a detecção de material genético do vírus através da técnica de PCR em tempo real, utilizou-se o kit *NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos*. Foram avaliadas 55 amostras datadas entre o período de Setembro de 2021 a Março de 2022. Para o presente estudo, todas as amostras demonstraram valor de leitura

da amostra/valor de “CUT off” (S/CO) > 0,8 e NAT indetectável.

3 I RESULTADOS

De acordo com os resultados de eletroquimioluminescência, utilizando-se o ensaio *Elecsys ® AntiHCV*, de 55 amostras, 32,8% (17/55) apresentaram resultado de eletroquimioluminescência inconclusivo (valor de “cut off” (S/CO) 0,8 a 1,2) e 67,2% (37/35) apresentaram resultado de eletroquimioluminescência positivo (valor de “cut off” (S/CO) > 1,2). Entre as amostras que tiveram resultado de eletroquimioluminescência inconclusivos, 100% (17/17) apresentaram resultados de imunocromatografia negativos. Entre as amostras que apresentaram eletroquimioluminescência positiva, 97,2% (36/37) apresentaram resultados de imunocromatografia negativos e 2,8% (1/37) apresentaram resultados de imunocromatografia indeterminados. Não houve resultado positivo.

4 I CONCLUSÃO

Portanto, diante dos resultados do teste realizado, tem-se avaliação positiva do teste suplementar *Geenius™ HCV Supplemental Assay*. O ensaio de imunocromatografia possibilitou, de forma eficiente, a confirmação da não exposição ao HCV em doadores com resultados de triagem sorológico-molecular discordantes, permitindo, dessa forma, que os doadores anti-HCV positivos na triagem sorológico-molecular recebessem a devida orientação.

O presente estudo sugere que testes mais específicos sejam realizados nos hemocentros, em procedimentos de triagem, a fim de mitigar os transtornos causados por resultados falso positivos em populações de baixo risco. A adoção de tal conduta implicaria em menor desperdício de bolsas de sangue íntegras, além de evitar a ansiedade causada em doadores diante da falsa detecção do HCV em amostras sanguíneas.

Ademais, resultados não assertivos em triagem sorológico-molecular acarretam em maior gasto de recursos para o hemocentro, pela necessidade da realização de testes adicionais. A utilização de *Geenius™ HCV Supplemental Assay* em etapa confirmatória tem sua relevância ratificada por possibilitar a comparação de testes diferentes, de princípios semelhantes – detecção de anticorpos – na mesma amostra. Dessa forma, sendo possível confirmar a aptidão das bolsas de sangue analisadas.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais**. Brasília, DF, 2018. [1]

Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay. [Bula]. Bio-Rad Laboratories. California, 2018. [2]

Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos. [Bula]. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2022. [3]

VIANA, R. D.; VELOSO, M. N.; NETO, C. O.; PAPACOSTA, G. N.; NUNES, M. G.; GUEDES, R. V. Hepatite B e C: diagnóstico e tratamento. v. 4 n. 3 (2017), Revista de Patologia do Tocantins, 2017.[4]

CAPÍTULO 5

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO SUCO DA POLPA DE GOIABA DO RESTAURANTE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Data de aceite: 28/09/2022
Data de submissão: 05/09/22

Yasmin Pereira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará
Fortaleza-Ceará
http://lattes.cnpq.br/4397753086227908

RESUMO: O presente artigo tem como objetivo caracterizar os micro-organismos presentes no suco da polpa de goiaba do restaurante universitário através de análises microbiológicas desde o processo de estocagem, armazenamento e manipulação com intuito de identificar possíveis contaminações por microbiotas patógenos. Normas de referência RDC A RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, regulamentando pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), considera a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos avaliar as condições higiênicas sanitárias de unidades produtoras de refeição. Estudo trata-se de uma análise microbiológica de caráter descritiva experimental quantitativa, da amostra do suco da polpa de goiaba coletada no restaurante da Universidade Federal do Ceará.A metodologia aplicada na pesquisa foi plaqueamento “Spreader Plate”, onde as amostras são maceradas e diluídas, posteriormente elas são pipetadas em placas de Petri esterilizadas contendo o meio de cultura Ágar padrão para as análises de termófilas, psicrófilas, mesófilas e, nas análises de bolores e leveduras.Concluindo assim, que as análises realizadas não foram encontrados micro-organismos mesófilos, psicrófilos ou termófilos, pela contagem expressa em número de bactérias por mililitro.Entretanto às análises de bolores e leveduras obtiveram resultados positivos, pela escala de contagem, com valores entre 30 e 300 colônias ou 3,0 x 10^2. UFC/mL.Sendo assim,percebermos á importância das análises microbiológicas do suco da polpa de goiaba é essencial para os parâmetros de sanidade do produto e a redução de possíveis doenças alimentares, ocasionados por micro-organismos.
PALAVRAS-CHAVE: Contaminação; Micro-organismo; Análise de polpa de goiaba.

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF THE GUAVA PULP JUICE FROM THE RESTAURANT OF THE FEDERAL UNIVERSITY OF CEARÁ

ABSTRACT: This article aims to characterize the microorganisms present in guava pulps from the university restaurant through microbiological analysis from the storage and storage process in order to identify possible contaminations caused by these pathogens. In the production of the product, identify the sterilization method to reduce the risk of the presence of microbiota, assisting in the good manufacturing practices required by the sanitary surveillance (ANVISA), in guaranteeing an integral food insurance. This is a quantitative study with microbiological laboratory analysis and the contribution of a bibliographic reference seeking a study that identifies

possible contamination, considering descriptive research. In conclusion, the importance of characterizing the guava pulp microbiota is essential for the health parameters of the product and the reduction of foodborne diseases.
KEYWORDS: Contamination; Microorganism; Analyze guava pulp.

INTRODUÇÃO

A comercialização de produtos derivados de produtos derivados de frutas tem aumentado todo o mundo, sendo que a demanda apresenta tendência de crescimento devido as suas características e vantagens a saúde. Porém sua alta perecibilidade das polpas de forma geral sua constituição tem elevada atividade de água que requer uma necessidade ainda maior na produção, armazenamento e manipulação para evitar possíveis contaminações.

Segundo Silva et al.,(2012) a manipulação de alimentos de forma inadequada também podem contribuir para possíveis contaminações, uma vez que pode haver contato com os micro-organismos de forma direta ou indireta através por veículos animados ou inanimados, nas bancadas, como na parte externa do seu corpo (mãos, pele e cabelos), na parte interna (boca, garganta e nariz) e nas suas secreções (fezes, urina, saliva e suor).

A preocupação com a qualidade e segurança dos alimentos é uma questão mundial de saúde pública, pelo fato de podermos ingerir algum tipo de alimento contaminado por micro-organismo. Sendo assim, é importante a realização de análises microbiológicas para analisar a possível presença de micro-organismos, outro ponto se ressaltar são as condições sanitárias para que os alimentos estejam seguros, que não cause nenhum dano à saúde da população.

Segundo Silva et al., (2014) as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), na grande maioria, têm suas ocorrências clínicas ocasionadas pela ingestão de alimentos que estão contaminados com micro-organismos patogênicos ou objetos que contenham estruturas tóxicas em quantidades que afetam a saúde do consumidor, podendo ser a nível individual ou coletivo da população.

Dentre os fatores de contaminação, termos cruzada, que poderá ocorrer por falta de higienização dos colaboradores ou pelo transporte com refrigerações inadequadas para os alimentos, podendo interferir na qualidade dos sucos feitos de polpas de frutas, facilitando assim, o crescimento de bolores e leveduras, podendo causar surtos de doenças transmitidas por Alimentos.

Segundo Santos et al.,(2017) os estabelecimentos comerciais ou institucionais produtores de refeição podem ser, de forma direta, propícios à contaminação microbiana. Algumas pesquisas revelaram a presença de micro-organismos patogênicos em unidades de alimentação escolar, hospitalar e restaurantes universitários e outros, apresentando coliformes a 35ºC e a 45ºC, Staphylococcus coagulase positiva, bolores e leveduras, além

das bactérias patogênicas.

METODOLOGIA

Esse estudo de análise microbiológica de caráter descritiva experimental quantitativa, da amostra do suco da polpa de goiaba coletada no restaurante da Universidade Federal do Ceará tem o intuito de identificar possíveis contaminações em decorrência de deficiências possivelmente existentes no processo da preparação dos refrescos.

O acompanhamento será composto por visitas semanais no período de 2 semanas, sendo realizadas 2 coletas ao dia, contemplando hora do almoço e jantar. Pesquisa realizada no mês de setembro de 2020, mês de sazonalidade da fruta na cidade. As amostras coletadas do suco de goiaba, foram adicionadas em Frasco *Plástico* Com Tampa Esterilizado 100 ml e transportadas a 25ºC para o laboratório.

Local da coleta foi o Restaurante Universitário, produto escolhido para análise foi suco da polpa de goiaba congelada, não há pasteurização no seu processo, oriunda da empresa de polpas de frutas in natura localizada no Estado do Ceará, que são distribuídas e utilizadas na preparação dos refrescos que acompanham o almoço e jantar dos universitários.

Norma de referência RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, regulamentando pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), considera a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos avaliarem as condições higiênicas sanitárias de unidades produtoras de refeição, bem como a análise microbiológica das bancadas e do processo de manipulação dos alimentos. Os Valores utilizados na pesquisa será pela contagem é expressa em número de bactérias por mililitro do meio de cultura ou UFC/mL.

Segundo á Resolução atualizada RDC n° 331 publicada em 23 de dezembro de 2019, que revoga a RDC nº 12/2001 (antiga RDC de parâmetros microbiológicos para alimentos),estabelecem novos padrões para as analises microbiológicos,dentre elas, determinação da amostra representativa, ou seja,constituída de um determinado número de unidades amostrais (n), retiradas de forma aleatória de um mesmo lote,e nenhuma unidade amostral pode apresentar valores superior que 10^2 UFC por grama (M).Padrão microbiológico dos alimentos será pelo critério que define a sua aceitabilidade de um lote ou processo do produto, baseado na ausência/presença ou na concentração de micro-organismos.Com objetivo de avaliar as condições microbiológicas dos lotes e permitir assim,melhor vigilância dos produtos sobre a sua aceitação ou rejeição,e possíveis contaminações.

Existem duas técnicas de contagem microbiológicas dos alimentos: a Contagem em superfície ou “Spreader Plate” e a Contagem em Profundidade ou mistura ou “Pour Plate”. Em ambas as técnicas, a suspensão microbiana é diluída, e uma alíquota de volume

conhecido de cada diluição em uma placa com posterior derramamento do meio fundido ou no próprio meio de cultura na placa de Petri.

Método escolhido "Spreader Plate" para análise de alimentos, no processo as amostras são maceradas e diluídas, posteriormente elas são pipetadas em placas de Petri esterilizadas contendo o meio de cultura Ágar padrão para as análises os termófilos, psicrófilos, mesófilas.

No procedimento 25 mL do alimento, foram selecionados para a análise, contendo 225 ml de água peptonada ou salina esterilizada 0,85%. Na diluição 1:10 (10-1); transferir 1,0 mL desta diluição para um frasco contendo 9,0 mL do diluente (diluição (1:100 - 10^2) e, posteriormente será pipetada 0,1mL (100µl) de cada diluição e transferir para uma placa contendo meio de cultura esterilizados e espalhar a alíquota com o auxílio da alça de Drigalsky até que o líquido tenha sido absorvido pelo meio de cultura. Nas análises de bolores e leveduras foi utilizado o meio Agar bata dextrose fundido.

No laboratório as placas foram incubadas em estufas, os termófilos temperatura em torno de 60°C; psicrófilos em 10°C; mesófilas entre 35°C; e psicrotróficos, temperatura entre 30 ou 35°C.Incubar as placas em posição invertida por 48h. Realizou-se o mesmo processo para as demais diluições (10^2 - 10^3), nas análises para bolores e leveduras, as placas foram incubadas em estufa a 25ºC por 5 dias, para leitura das placas.

Após incubação, as colônias bacterianas são contadas em um contador de colônias que pode ser manual ou digital. O método de contagem total de micro-organismos de alimentos por meio de placas baseado no plaqueamento de alíquotas do produto homogeneizado e de suas diluições, onde é utilizado o meio de cultura Ágar Padrão para Contagem. A temperatura e tempo são pontos importantes na pesquisa para haver à incubação pois, possibilita a contagem de diferentes tipos de micro-organismos como: psicrotróficos, mesófilos, termófilos e termodúricos. Este método também se aplica para análises de bolores e leveduras, variando-se o meio de cultura e a temperatura de incubação.

Para estabelecer o número de micro-organismos na amostra original são selecionadas placas com o número de colônias entre 25 e 250. Menos de 25 colônias o resultado não é confiáveis, possíveis contaminantes podem causar ao menos 4% de erro. No caso de uma placa com mais de 250 colônias, a contagem torna-se mais difícil. A contagem é realizada em número de bactérias por mililitro do meio de cultura ou UFC/ml. Diluição refere-se à diluição da amostra, sendo 30 colônias encontra-se presentes em uma placa com diluição 1:100, ou cálculo pode ser:

Portanto, a forma mais confiável utilizado a fórmula utilizada na pesquisa que será 30 a 300 ou 3,0 x 10^2 UFC/ml. (Unidade Formadora de Colônia), foram os valores encontrando nas amostras para bolores de leveduras nesta pesquisa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises realizadas não foram encontrados micro-organismos mesófilos, psicrófilos ou termófilos, pela contagem expressa em número de bactérias por mililitro do meio de cultura ou UFC/ml. Segundo á regulamentação pela resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 que aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, os resultados são obtidos por contagem em placa, estes devem ser expressos em LTFC/ g ou mL (Unidades Formadoras de Colônias por grama ou mililitro) (Brasil, 2001).

Os valores encontrados na pesquisa, foram inferiores a 25 a 250 colônias ou 2,0 x 10^2, realizando por contagem no microscópio. Assim, evidenciando resultados satisfatório as condições de higiene e santificação dentro dos qualidade microbiológica. Segundo Dantas et al., (2012). Para melhor avaliação da carga microbiana das amostras, importante realizar as determinações de bactérias mesófilas. Apesar da legislação atual não utilizar como critério para reprovar o consumo dos alimentos oriundos da polpa de frutas, estas são utilizada como indicador de qualidade sanitária dos alimentos.

Em relação às análises de bolores e leveduras obtiveram resultados positivos, pela escala de contagem, com valores entre 30 e 300 colônias ou 3,0 x 10^2. UFC/mL. Segundo Santos et al., (2014) polpas in natura produzidas na cidade de Russas-CE, apresentaram resultados positivos para contaminantes para bolores e leveduras, variando de 1,3.102 até 7,6.104 UFC.g-1. Sendo assim, podendo haver risco ao colocar a saúde do consumidor, visto que muitos micro-organismos são capazes de produzir micotoxinas, as quais são termorresistentes e podem ser resistente a diversos procedimentos para sua eliminação.

Segundo Dantas et al., (2012) todos os alimentos, independente de sua origem, podem apresentar alguma forma de microbiota, concentrada principalmente na região superficial, tanto de vegetais, frutas e animais, possam apresentar vidas microbianas viáveis. As frutas com atividade de água (Aa) maior que 0,98 são mais susceptíveis à deterioração por bactérias, bolores ou leveduras.

CONCLUSÃO

De forma geral, as amostras do suco da polpa de goiaba não apresentaram microbiotas patógenos. No entanto, há constatação de bolores e leveduras, remetem à necessidade de um controle higiene sanitária no ambiente de manipulação dos alimentos, com objetivo de minimizar possíveis contaminações dos alimentos e danos a saúde dos consumidores.

Há necessidade de aprofundar a pesquisa, com levantamento bibliográfico de outros autores que realizaram outras análises microbiológicas as quais contribuirão para manutenção das Boas Práticas de Fabricação. Pois há escassez de pesquisa na área que utilizar o método de contagem total de micro-organismos de alimento.

Concluindo assim, a importância de análise microbiológica do suco da polpa de

goiaba é essencial para os parâmetros de sanidade do produto e a redução de possíveis doenças alimentares, ocasionados por micro-organismos.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **RESOLUÇÃO – RDC Nº 331, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019. 2019.** Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272.> Acesso em 15/10/2021.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001, Seção I, p. 45-53. Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html>.Acesso em 20 de agosto de 2021.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC **N**°275, de 21 de outubro de 2002. Boas Práticas **de Fabricação**. Disponível em: http://legis.an visa.gov.br/. Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/anexos/anexo_res0275_21_10_2002_rep.pdf>.Acesso em 14/10/2020.

DANTAS, R. L.; ROCHA, A. P. T.; ARAÚJO, A. S.; RODRIGUES, M. S. A.; MARANHÃO, T. K. L. **Qualidade microbiológica de polpa de frutas comercializadas na cidade de Campina Grande-PB.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.14, n.2, p.125-130, 2012. Disponível em :< http://deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev142/Art1421.pdf>.Acesso em 25/09/2021.

GOMES, S. R.; FREITAS, F. V.; PAULA, A. H.; BARBOSA, W. M. **Condições higiênico-sanitárias de restaurantes comercial do bairro Parque Residencial Laranjeiras, município de Serra**, ES. Rev. Hig. Alimentar, São Paulo, v.29, n.240-241, pp.80-84, 2015. Disponível em : <https://higienealimentar.com.br/wp-content/uploads/2019/07/240-241-1.pdf>.Acesso em 02/09/2021.

SANTOS, W. C.; NASCIMENTO, A. R. **Caracterização microbiológica de polpas de quatro frutas regionais comercializadas nas feiras de São Luís-MA.** Caderno de Pesquisa, São Luís, v. 21, n. especial, jul. 2014. Disponível em:<http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/view/2615>.Acesso em 05/10/21.

SANTOS,E.C.C.;SANTANA,R.F.;JUNIOR,N.M.V.;MIRANDA,A.D.S.;**Determinação da qualidade microbiológica de polpa de frutas congeladas utilizando a técnica de filme de petri.**Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.19, n.3, p.247-253, 2017 247 ISSN 1517-8595. Disponível em : < http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev193/rev1933.pdf>. Acesso em : 07/10/21.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação.** 7. ed., São Paulo: Varela, 2014.Disponível em: < http://biblioteca.claretiano.edu.br/anexo/000096/00009662.pdf>.Acesso em 07/10/21.

SILVA, A. V. C.; SILVA, A. C. **Qualidade da Polpa Congelada de Mangaba Comercializada** em Aracaju - SE, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. Disponívelem:<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/75632/1/BP70.pdf. Acesso em 15/09/21.

SOBRE A ORGANIZADORA

ALANA MARIA CERQUEIRA DE OLIVEIRA - Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Estadual de Santa Cruz -UESC (2002) com habilitação pelo CRBM 4 em Patologia Clínica -Análises Clínicas e Biologia Molecular , licenciada em Biologia pela Faculdade Cruzeiro do Sul (2020), licenciada em Pedagogia pela Faculdade Faveni (2021). Em 2021 se especializou em Saúde indígena pela Faculdade Dom Alberto. Obteve seu Mestrado (2006) e o Doutorado (2011) em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP-USP. Pós-Doutorado pelo Instituto Nacional de células Tronco, INCTC -USP (2012). O segundo Pós-doutoramento foi realizado pelo departamento de Clínica Médica Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP-USP (2014). Seu terceiro Pós-Doutorado pelo Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras-FFCL-USP (2016). É docente na Universidade Federal do Acre -UFAC no Colégio Aplicação.

ÍNDICE REMISSIVO

A

B

C

D

E

H

I

L

M

O

P

R

S

T

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Microbiologia:

Geração de conhecimento e caráter multidisciplinar

Ano 2022

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Microbiologia:

Geração de conhecimento e caráter multidisciplinar

Ano 2022